

⑫ 公表特許公報(A)

平5-504889

⑬ 公表 平成5年(1993)7月29日

⑭ Int. Cl.⁹C 12 Q 1/68
C 12 N 15/11

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8114-4B

8931-4B

審査請求有

予備審査請求有

C 12 N 15/00

A※

部門(区分) 1(1)

(全60頁)

⑯ 発明の名称 16S及び23S rRNA遺伝子間のスパーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプローブ

⑰ 特 願 平3-508127

⑱ 出 願 平3(1991)4月18日

⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)10月19日

⑳ 国際出願 PCT/EP91/00743

㉑ 国際公開番号 WO91/16454

㉒ 国際公開日 平3(1991)10月31日

優先権主張 ㉓ 1990年4月18日 ㉔ 欧州特許機構(E P) ㉕ 90401054.3

⑳ 発 明 者 ロツサウ, リュディ

ベルギー国、ペー-2070・エケレン、ウイヘルヘーベストラート・45

㉑ 出 願 人 エヌ・ペー・イノヘネティクス・エス・アー

ベルギー国、ペー-9710・ヘント、ボックス・4、インドウストリ-バルク・ズベイナーデ・7

㉒ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外3名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌のrRNA遺伝子間のスパーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチド〜スパーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成されるプローブ。

2. 検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌に固有であるように選択されたrRNA遺伝子間のスパーサー領域、特に16S rRNA遺伝子及び23S rRNA遺伝子間のスパーサー領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアクセシブルなプローブであって、rRNA遺伝子間のスパーサー領域の前記配列が、

・ 目的生物のrRNA遺伝子間のスパーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のrRNA遺伝子間のスパーサー領域のヌクレオチド配列と比較し、

・ 最近隣種のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスパーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスパーサー領域の少な

くとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又は

・ 細菌スパーサー領域を得るように、目的生物のrRNA遺伝子間のスパーサー領域からrRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ、

・ 少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜スパーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより、

選択されることを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

3. 一核酸グループ:

グループNC11:

CGATCGCTCG TTATTCTACT TCGC

NC11

CCCAACTACA ATAACCACGC ATCC

NC111C

CCCAAGUACA AUAACGACGC AUCC

NC111CR

CCAUGCGUCC GUADUCUACU UCCG

NC11R

グループNC12:

特表平5-504889 (2)

TTCTGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NG12	TCCGTTCCAT ATTGCTATCT ACTGTCCA	NH14
CTTTGCTTAC TTAGTCAAGC GGTAGCTAAA CGAA	NG121C	TCCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACCCA	NH141C
GUUUGCUUAC UGAGUCAAGC GCUAGCUAAA CGAA	NG121CR	UGCACAGUAC AUAGCAAUUU CGAACCCA	NH141CR
UUGCUUUAAC UACCCCUUGA CUAAGUAAGC AAAC	NG12R	UGCCUUGCAU AUUGCUAUUU ACUGUGCA	NH14R
グループNH11:			
GCTCAAGTGT GACGTGCCCC TG	NH11	TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTGCCCCCTGAATGCATTCTGTTCATT	
CAGGGCGAGC TCACACTTGA CC	NH111C		NH15
CAGGGCGAGC UGACACUUGA CC	NH111CR	AATCGAACACAAATCCATTACGGGCGACGTCACACATTGACCAACAACAATA	
GCUCAAGUGU GACCGCGCCCC UC	NH11R		NH151C
グループNH12:			
CTTCTTGGTC AAGTGTGAGC TC	NH12		
GACGTACAC TTGACCAAGA AC	NH121C	UUUUGUUCUUGGUCAAAGUGAGCGCGCCCUUAAUGGAUUUCUUGCCAAUU	
GACGUCACAC UGACCAAGA AC	NH121CR		NH15R
GUUCUUGGUC AAGUGGAGC UC	NH12R	グループNH18:	
グループNH13:			
CCGTTGCTTA TAGCTATCTA CTGTCC	NH13	TTTGCTTAAC ATTCCGTTCA CTAGAACATC AGAC	NH18
GCACACTAGA TAGCTATAAC GAACCC	NH131C	GTCTGATGTT CTAGTCAAGC GAATGTTAGC CAAA	NH181C
GCACACUAGA UAGCUAUAAC GAACCC	NH131CR	GUCUGAUGUU CUAGUCAAGC GAUUGUAGC CAAA	NH181CR
CCGUCGCUUA UAGCUAUCUA CUGGCC	NH13R	UUUGCCUAAU AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC	NH18R
グループNH14:			
		グループBD11:	BD11
		TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	
グループBC11:			
CAATATGCCT CCGGCATAAT AA	BD111C	AACTGCGGTC AATTTGATGC GT	RI111C
CAAUAUAGCCU CCGGCAUAAU AA	BD111CR	AAGUGCGGUC AAUUUGAUGC GU	RI111CR
UUUAUAUGCG CGAGGCAUAAU UC	BD11R	ACGCAUCAAU UUGACCGCAC UU	RI11R
グループBC12:			
TTAAACATCT TACCAAAAC	BC11	ACTTTGAAGT GAAAACTTAA AG	RI12
CTTTGCTTAA ATGTTTAA	BC111C	CTTTAAGCTTT TCACTTCAAA GT	RI121C
CUUUGCUAAAC AUGUUUAA	BC111CR	CUUUAAAGUUU UCACUUCAAA GU	RI121CR
UUAAACAUCU UACCAAAAC	BC11R	ACUUUGAAGU GAAACUUUAA AG	RI12R
グループBC12:			
TTGATGTTTA AACTTGCTTC GTGA	BC12	AATCGAAAGC TTCAAATTTCT T	SA11
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC121C	AACAATTTCA ACCTTTCCAT T	SA111C
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC121CR	AACAABUUCA ACCUUUGCAU U	SA111CR
UUGAUGUUUA AACUUGGUGU GUGGA	BC12R	AAUCCGAAAGC UUCAAAUUCU U	SA11R
グループBP11:			
CCACACCCA? CCTGTGACA GCCTT	BP11	GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT	SA12
AAGCCTGTCC AGAGCATGCC TGTCC	BP111C	AAGACGCCAA TCCACGCTTT CC	SA121C
AAGCCUGGCC AGAGGAUGGC UGUGG	BP111CR	AAGACGCCAA UGCAGCGUUU CC	SA121CR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGUUU	BP11R	CGAAACCGGC CAUUUGCGGC UU	SA12R
グループH11:			
ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	H11	グループSA13:	SA13
		TCCACCATCT ACAAATAGAT TGTAGAA	

TTCTACAATC TATTTCTACA TCGTGG
UUCUACAACU UAUUUCUACA UCGUGCA
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA

グループSAI4:

TCTAGTTTTA AAGAACTAG GTT
AACCTAGTTT GTTAAACT AGA
AACCUAGUUU CUUAAAACU AGA
UCUAGUUUUA AAGAAACUAG CUU

グループSPII:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA
TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC
UGCAGUACUU GCGAUCUCU CAC
GUGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA

グループSPI2:

AGCAACTGCG CATTCGTCTT
AAGACCAATC GCGAGTTCTT
AAGACCAATC GCGAGTTCTT
AGCAACUCCG CAUUGGUCUU

グループSPI3:

GAGTTTATCA CTGAAAGCTC AGAA

SAI3IC

SAI3ICR

SAI3R

SAI4

SAI4IC

SAI4ICR

SAI4R

SPII

SPIIIC

SPIIICR

SPIIR

SPI2

SPI2IC

SPI2ICR

SPI2R

SPI3

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

UUCUGACCUU UCACUCAUAA ACUC

GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA

SPI3IC

SPI3ICR

SPI3R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載のアローブ、

4. 1種以上の Neisseria gonorrhoeae 株を検出するためのアローブであって、

ー核酸グループ:

グループNGI1:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC

NGI1

CCGAACTAGA ATAACGACGC ATCG

NGI1IC

CGCAACUAGA AUAACGACGC AUCC

NGI1ICR

CGAUCCGUCG UAUUUCUACU UCCG

NGI1R

グループNGI2:

TTGCTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC
GTTTGCTTAC TTAAGTAAGC GGTAGTAAGC CGAA
GUUUGCUUAC GUAGUCAAGC GGUAGCUAAA CGAA
UUGGUUUUAC UACCCGUGCA CUAAGTAAGC AAAC

NGI2

NGI2IC

NGI2ICR

NGI2R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするアローブ、

5. 生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae 株を検出するための方法であって、場合に

よりアローブの標的配列を交叉する (flanking)

2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アローブとサンプル中に存在し得る Neisseria gonorrhoeae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のアローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Neisseria gonorrhoeae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法、

6. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%P1c011、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サ

テ種子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50℃の範囲及び/又は洗浄温度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

CCCAACTACA ATAACGACGC ATCG

HT及び/又はWT: 50℃、

GGUUGCUUAC UAGGCAACG CGUAGGUAAC CGAA

HT及び/又はWT: 50℃であることを特徴とする請求項5に記載の生物学的サンプル中で*Neisseria gonorrhoeae*を検出するための方法。

7. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全*Neisseria gonorrhoeae*株をin vitro検出するためのキットであって、

—請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—これらのプローブと多数、好ましくは全*Neisseria*

—酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

8. 1種以上の*Neisseria meningitidis*株を検出するためのプローブであって、

—核酸グループ:

グループNH11:

GCTCAACTGT GACGTGCCCC TG	NH11
CAGGCGGACG TCACACTTGA CC	NH11IC
CAGGCGGACG UCACACDUCA CC	NH11ICR
GGUCAAGUCU GAGGUCGCCC UC	NH11R

グループNH12:

CTTCTTGCTC AAGTGTGACG TC	NH12
GACGTACAC TTGACCAACA AC	NH12IC
CACGUCACAC UUGACCAACA AC	NH12ICR

*ia gonorrhoeae*株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—同一核酸分子を断片的にし、少なくとも1種が*Neisseria gonorrhoeae*に対して特異的であり且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—該プローブの断片的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

GGUUGGUC AAGUCUCACG UC	NH12R
グループNH13:	
CGCTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTCC	NH13
CCACACTAGA TAGCTATAAC CAACCC	NH13IC
CCACAGUAGA UAGCUAUAAC CAACCC	NH13ICR
CGGUUGCUA UAGCUAUCUA CUCUCC	NH13R
グループNH14:	
TGGCTTCGAT ATTCTATCT ACTGTGCA	NH14
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NH14IC
UCCACAGUAG AUAGCAUAU CGAACGCA	NH14ICR
UGCGUUGCAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NH14R
グループNH15:	
TTTTGTTCTTGCTCAAGTGTGACGTGCGCCCTGAATGCAATCTGTTCATTT	NH15
AATGGAACAGAAATCCATTGAGGCGGACGTACACTTGACCAAGAACAAAA	NH15IC
AAUGGAACAGAAUCCAUCACGGCGGACGUCACACUUGCAAGAACAAAA	NH15ICR
UUUUGUUCUUGGCUAAGUGGACGUGCGCCGCAAGUUGCAUUCGUGUCCAUU	NH15R

グループNM16:

TTTGCCTAAC ATTCCCTTGA CTAGAATC ACAC	NM16
CTCTGATCTT CTAGTCAACG CAATCTTACG CAAA	NM16IC
CUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUAGG CAAA	NM16ICR
UUUGCCUAAU AUUGCCGUCA CUAGAACAUC ACAC	NM16R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非特異配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下、

・ 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・ 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするアローブ、

9. 生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis 株を検出するための方法であって、場合によりアローブの鎖的配列を又とする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介

アローブが請求項8に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40〜58℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40〜58℃の範囲に適宜調節され、特に、前記鎖的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々、

CAGGGCCAGC TCACACTTGA CC

HT及び/又はWT: 45℃、

GACGTCAAC TTGACCAAGA AC

HT及び/又はWT: 45℃、

GCACACTAGA TAGCTATAAC GAACGC

HT及び/又はWT: 40℃、

TGCACACTAG ATACCAATAT CCAACGCA

HT及び/又はWT: 48℃、

TTTTTCTTCTTGCTCAAGGTGACGCTCCCTGGAATGGATTCTGTTCCATT

HT及び/又はWT: 58℃、

CTCTGATCTT CTAGTCAACG CAATCTTACG CAAA

HT及び/又はWT: 50℃であることを特徴とする請求項5に記載の生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis を検出するための方法、

11. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Neiss

するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アローブとサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項8に記載のアローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法、10. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア

seria meningitidis 株を in vitro 検出するためのキットであって、

・ 請求項8に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、

・ これらのアローブと多数、好ましくは全 Neisseria meningitidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

・ 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを即時検出するための手段とを含むか、又は

・ 同一核酸分子を鎖的にし、少なくとも1種が Neisseria meningitidis に対して特異的であり且つ請求項8に記載のアローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のアローブと、

・ これらのアローブと Neisseria meningitidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

・ 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

ドを同時検出するための手段とを含むか、又は

— 固体支持体に固定された請求項4に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

— 該プロープの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を同時実施するために必要なプライマーと、

— 酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプロープと *Neisseria meningitidis* 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを同時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

12. 1種以上の *Haemophilus ducreyi* 株を検出するためのプロープであって、

— 核酸グループ：

TTATTATCGG CGAGGCAUAT TC	BD11
CAATATGCCT CGCCGATAAT AA	BD11C
CAAUAGCCU CGCGCAUAAU AA	BD11CR

る *Haemophilus ducreyi* 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のプロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る *Haemophilus ducreyi* 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

14. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断定性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプロープが請求項12に記載のプロープのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40℃の範囲及び／又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該ハイブリダイゼーション温度(HT)

QUAUAUCCG CGAGGCAUAD UG

BD11R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

— 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

— 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

— その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプロープ。

13. 生物学的サンプル中で *Haemophilus ducreyi* 株を検出するための方法であって、場合によりプロープの標的配列を突如する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得

及び洗浄温度(WT)が夫々、

CAATATGCCT CGCCGATAAT AA

HT及び／又はWT: 40℃であることを特徴とする請求項13に記載の生物学的サンプル中で *Haemophilus ducreyi* を検出するための方法。

15. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 *Haemophilus ducreyi* 株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

— 請求項12に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

— これらのプロープと多数、好ましくは全 *Haemophilus ducreyi* 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを同時検出するための手段とを含むか、又は

— 同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が *Haemophilus ducreyi* に対して特異的であり且つ請求項12に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

-これらのプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの順的配列を含むDNA及び/又はRNAの断片的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-断片的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

16. 1種以上の Branhamella catarrhalis 株を検出するためのプローブであって、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

17. 生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの順的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

18. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

・核酸グループ:

グループBC11:

TTAAACATCT TACCAAAG	BC11
CTTTCCTAAG ATCTTTAA	BC11IC
CUUUGCUAAG AUGUUUAA	BC11ICR
UUAAACAUCU UACCAAAG	BC11R

グループBC12:

TTGATCTTTA AACTTCCTTG GTCCA	BC12
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC12IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC12ICR
UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA	BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA順的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%F1col1、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項16に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30〜42℃の範囲及び/又は洗浄温度が約30〜42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記順的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

CTTTCCTAAG ATCTTTAA

HT及び/又はWT:30℃

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

HT及び/又はWT:42℃であることを特徴とする請求

項17に記載の生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 株を検出するための方法。

19. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 株をin vi

とろ抽出するためのキットであって、

- 請求項16に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

- これらのプロープと多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Branhamella catarrhalis に対して特異的であり且つ請求項16に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

- これらのプロープと Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- 前記配列のいずれかで1種以上のヌクレオチドが置換されているか、

- その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプロープ。

21. 生物学的サンプル中で Bordetella pertussis 株を検出するための方法であって、場合によりプロープの標的配列を夾束する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る Bordetella pertussis 株の相補的

- 固体支持体に固定された請求項16に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

- 該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素増幅が可能であり及び/又はこれらのプロープと Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

20. 1種以上の Bordetella pertussis 株を検出するためのプロープであって、

- 核酸グループ:

グループBP11:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BP11
AAGCCTGTCC ACAGGATCGG TCTGG	BP11IC
AAGCCUGGCC ACAGCAUGCC UGUGG	BP11ICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GCGUU	BP11R

核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項20に記載のプロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Bordetella pertussis 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

22. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMリン酸緩衝液pH7.1、2.0%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの野断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び2.0%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプロープが請求項20に記載のプロープのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AACCCCTGTC ACAGGATGGG TGTCG

H T及び/又はW T: 55℃であることを特徴とする請求項21に記載の生物学的サンプル中で Bordetella pertussis を検出するための方法。

23. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Bordetella pertussis 株を in vitro 検出するためのキットであって、

- 請求項20に記載のアプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアプローブと、
- これらのアプローブと多数、好ましくは全 Bordetella pertussis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
- 同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Bordetella pertussis に対して特異的であり且つ請求項20に記載のアプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のアプローブと、
- これらのアプローブと Bordetella pertussis

24. 1種以上の Haemophilus influenzae 株を検出するためのアプローブであって、

- 核酸グループ:

グループH111:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	H111
AAGTGGCGTC AATTTGATGC GT	H111C
AACUGCGGUC AADUUGAUGC GU	H111CR
ACGCAUCAA UUCACCGCAC UU	H111R

グループH112:

ACTTTGAAGT CAAAACCTAA AG	H112
CTTTAAGTTT TCACCTTCAA GT	H112C
CUUUAAGU UUACUUCAAA GU	H112CR
ACUUCACGU CAAAACUAAA AG	H112R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- 矢々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

ass 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
- 固体支持体に固定された請求項20に記載のアプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアプローブと、
- 該アプローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
- 酵素増幅が可能であり及び/又はこれらのアプローブと Bordetella pertussis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

- 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

- その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするアプローブ。

25. 生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae 株を検出するための方法であって、場合によりアプローブの標的配列を突変する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アプローブとサンプル中に存在し得る Haemophilus influenzae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項24に記載のアプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Haemophilus influenzae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

26. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1

×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、2.0%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断定性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び2.0%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35〜55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35〜55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AACTCCGCTC AATTTCATCC GT

HT及び/又はWT: 55℃、

CTTTAAGTTT TCACCTCAAA GT

HT及び/又はWT: 35℃であることを特徴とする請求項25に記載の生物学的サンプル中で Hae m o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e を検出するための方法、

27. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Hae m o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e を検出するための方法、

ドを同時検出するための手段とを含むか、又は

— 固体支持体に固定された請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

— 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの断片的増幅を同時実施するために必要なプライマーと、

— 断片的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Hae m o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを同時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット、

28. 1種以上の S t r e p t o c c o s s u s p n e u m o n i a e 株を検出するためのプローブであって、

— 核酸グループ;

グループSPI1:

CTCAGACATC ACCAAGTAAT CCA SPI1

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC SPI1IC

UGCAUACUUG GUGAUCUCU CAC SPI1ICR

o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e 株を i n v i t r o 検出するためのキットであって、

— 請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

— これらのプローブと多数、好ましくは全 Hae m o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを同時検出するための手段とを含むか、又は

— 同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Hae m o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e に対して特異的であり且つ請求項24に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

— これらのプローブと Hae m o p h i i l u s i n f i n f l u e n z a e 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを同時検出するための手段とを含むか、又は

GUGACAGATC ACCAAGUAAU CCA SPI1R

グループSPI2:

AGCAACTGCG CATTGGTCTT SPI2

AAGACCAATG CCGAGTTCTT SPI2IC

AAGACCAATG CCGAGUCCU SPI2ICR

AGCAACUGCG CAUUGGUCUU SPI2R

グループSPI3:

GAGTTTATCA CTGAAAGCTC AGAA SPI3

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC SPI3IC

UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC SPI3ICR

GAGUUAUGA CUCAAAGGUC AGAA SPI3R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

— 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

— 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

29. 生物学的サンプル中で Streptococcus pneumoniae 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Streptococcus pneumoniae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項28に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Streptococcus pneumoniae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

30. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

ナトリウム、pH7.0)、約25mMリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が次々、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HT及び/又はWT: 45℃、

AACACCAATC CCCAGTTCCT

HT及び/又はWT: 45℃、

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

HT及び/又はWT: 45℃であることを特徴とする請求項29に記載の生物学的サンプル中で Streptococcus pneumoniae 株を検出するための方法。

31. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

—請求項28に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—これらのプローブと多数、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Streptococcus pneumoniae に対して特異的であり且つ請求項28に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブと Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—固体支持体に固定された請求項28に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

32. 1種以上の Streptococcus agalactiae 株を検出するためのプローブであって、

—核酸グループ;

グループSA11:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T SA11

AACAATTGCA ACCTTTTCAT T SA11C

AACAAUUGA ACCUUCGUAU U SAI11CR

AAGCGAAAGG UUCAAAUUGU U SAI1R

グループSAI2:

GGAAACCTGC CATTTCGCTC TT SAI2

AAGACGCAAA TGGCAGCTTT CC SAI2IC

AAGACGCAAA UCCGAGGUUU CC SAI2ICR

CGAAACCGGC CAUUUGCGUC UU SAI2R

グループSAI3:

TCCACCATCT AGAAATAGAT TGTAGAA SAI3

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGA SAI3IC

UUCUACAAC UAUUUCUACA UCGUGGA SAI3ICR

UCCACGAGUC AGAAAUAGAU UGUAGAA SAI3R

グループSAI4:

TCTAGTTTTA AAGAAACTAG GTT SAI4

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA SAI4IC

AACCUAGUUU CUUUAUAAU AGA SAI4ICR

UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU SAI4R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非特異

ococcuu agalactiae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

34. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl), 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項32に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35〜45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35〜45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記核酸の配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AACAATTGA ACCTTTCGAT T

HT及び/又はWT: 35℃、

配列と同一のRNA又はDNA核酸とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

33. 生物学的サンプル中で Streptococcus agalactiae 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの核酸配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Streptococcus agalactiae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項32に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Streptococcus agalactiae

AAGACGCAAA TGGCAGCTTT CC

HT及び/又はWT: 45℃、

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGA

HT及び/又はWT: 45℃、

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA

HT及び/又はWT: 37であることを特徴とする請求項33に記載の生物学的サンプル中で Streptococcus agalactiae 株を検出するための方法。

35. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Streptococcus agalactiae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

・請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

・これらのプローブと多数、好ましくは全 Streptococcus agalactiae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

・前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連続検出するための手段とを含むか、又は

-同一核酸分子を断片的にし、少なくとも1種が Streptococcus agalactiae に対して特異的であり且つ請求項32に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

-これらのプロープと Streptococcus agalactiae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項32に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの断片的配列を含むDNA及び/又はRNAの断片的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-断片的増幅が可能であり及び/又はこれらのプロープと Streptococcus agalactiae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項36に記載のプロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

38. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を in vitro 検出するためのキットであって、

-請求項36に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-これらのプロープと多数、好ましくは全 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液

適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

36. 1種以上の Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するためのプロープであって、プロープが適切な条件下で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 由来のDNA及び/又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び/又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23S rRNA スペーサー配列から誘導される15〜最大数のヌクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプロープ。

37. 生物学的サンプル中で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための方法であって、場合によりプロープの断片的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な反応条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サ

ンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項36に記載のプロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-同一核酸分子を断片的にし、少なくとも1種が Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli に対して特異的であり且つ請求項36に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

-これらのプロープと Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項36に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの断片的配列を含むDNA及び/又はRNAの断片的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-断片的増幅が可能であり及び/又はこれらのプロープと

Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

39. 検出すべき微生物に特異的な請求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のプロープを使用して生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するための方法であって、好ましくはプロープ領域を交叉する少なくとも1組のアプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（該的配列を含む）DNA及び／又はRNAを標識し、増幅した該的配列と膜上のプロープとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプロープを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより

形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とする方法。

40. 生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するためのキットであって、

一検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のプロープの少なくとも1種と、

一該プロープの該的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプロープと検出すべき微生物のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

明 細 書

16S及び23SrRNA遺伝子間のスパーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプロープ

本発明は、ハイブリダイゼーション手順により生物学的サンプル中で非ウイルス微生物の特異的検出に使用するための、リボソームリボ核酸（rRNA）遺伝子、特に16S及び23SrRNA遺伝子間のスパーサー領域から誘導される核酸プロープに係る。

ここ10年間に多数の微生物で目覚ましい進歩が遂げられているが、現在使用されている診断手順はまだ手間がかかり、非感受性であり、非特異的である。これらの欠点の多くは核酸プロープを使用することにより解決することができる。これらの核酸プロープの例としては、全ゲノムデオキシリボ核酸（DNA）、プラスミド、リボプロープ又は合成オリゴヌクレオチドを挙げることができ、これらのプロープは生物学的サンプル中に存在するゲノムDNA、メッセンジャーRNA又は安定RNA種を該的にすることができる。必ずしもそうでなくてもよいが、合成オリゴヌクレオチドを使用すると好適である。オリゴヌクレオチドは化学的方法を使用して迅速に大量に合成することができ、

貯蔵寿命が長く、容易に精製及び標識できる。

DNAプロープ技術を使用して微生物を確実に診断するためには、使用されるプロープは高特異性（即ち他の生物に由来する核酸と交差反応すべきでない）且つ高感度（即ち検出しようとする生物の全部ではないとしてもほとんどの株がプロープと反応すべきである）であるべきである。従って、好適該的配列は以下の特徴を有するべきである。

（1）配列は該当生物の各株のゲノム中に存在すべきである。

（1.1）進化による配列の相違は、一方では該当種を他の密接に関連する種から区別できるようにするために十分な配列相違があり、他方では使用されるプロープで該当種の全株を検出できるようにするために十分な配列保存があるように構成されるべきである。

種特異的プロープは多数の生物について記載されている。最近の文献ではTenover, Clin. Microbiol. Rev. 1: 82-101, 1988を参照されたい。

しかしながら、ゲノム中のどの遺伝子から特異的プロープ配列を誘導できるのかについては不明である。プロープ

開発にあたっては、最終的に対象生物に対して特異的になるようなフラグメントを得るために大規模な選択手順に従わなければならないことが多かった (Korolik et al., J. Gen. Microbiol. 134: 521-529, 1988; Grimonet et al., J. Clin. Microbiol. 21: 431-437, 1985; Welcher et al., Nucl. Acids Res. 14: 10027-10044, 1986; Donegan et al., Mol. Cell. Probes 2: 13-26, 1989; Beaulieu and Roy, Abstract nr D249, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1989)。ほとんどの場合、特異的フラグメントが誘導される遺伝子の機能又は構造は解明されておらず、別の特異的プローブが所望される毎にスクリーニング手順を手探りで繰り返さなければならない。上記基準を満たし且つ偏在する遺伝子が数密に同定されるならば、時間と手間のかかる選択が不要にな

る。

16S又は23SrRNA遺伝子は、既に記載されている方法を使用して配列を容易に得ることができ、種特異的検出に使用可能なこれらの高保存性遺伝子内に種々の領域が存在することが知られているので、プローブ開発に適用されている。しかしながら、生物によっては進化による核酸配列保存性が非常に高いため、例えば16S及び23SrRNA遺伝子から高特異性で高感度のプローブを誘導できない場合がある。更に、これらの遺伝子の保存性の結果、限定的配列のみで1又は少数のミスマッチに基づいて2種の生物を区別しなければならないことが多くなり、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが必要になる。これらの条件から少しでも外れると、誤認の恐れがある。

従って、16S及び23SrRNA遺伝子から特異的プローブを誘導することができなかった種を含むほとんどの生物に種特異的なプローブを開発することができ、好ましくはより広いストリンジェンシー範囲を有する偏在遺伝子の特徴付けることができるならば、非常に有利である。

各種細胞生物は、その転写物がリボソームの機能とタンパク質の合成とに不可欠であるため、リボソームRNAシス

トロンを有する。一般に、遺伝子はゲノム中に多重コピー存在する。真正細菌では16SrRNA遺伝子【小サブユニットrRNA (srRNA) に同じ】はrRNAシストロンの5'末端に位置し、23SrRNA【大サブユニットrRNA (lrRNA) に同じ】が後続する。5SrRNA遺伝子はシストロンの3'末端に位置する。16S、23S及び5S遺伝子はスペーサー領域により分離され、これらのスペーサー領域には転写後プロセッシングに関与する転移RNA (tRNA) 遺伝子及びシグナル配列が位置し得る。まず最初にrRNAシストロンは前駆物質RNA分子として転写される。この一次転写物はエンドリボヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼにより更にプロセッシングされ、成熟産物を生成する。従って、スペーサー領域配列は生物のゲノム中のみに存在するのではなく、前駆体RNA分子及びプロセッシング産物中にも存在する。真正細菌rRNAシストロンの構造及びプロセッシングは、Gegenheimer and Apirion, Microbiol. Rev. 45: 502-541, 1981に詳細に記載されている。

真核生物の核ゲノム中の状況は多少異なり、srRNA

及びlrRNA間に5、8SrRNA遺伝子が位置しており、5SrRNA遺伝子は別個の長いタンデムアレー中に配置されている (Perry, Annu. Rev. Biochem. 45: 605-629, 1976; Long and Dawid, Annu. Rev. Biochem. 49: 727-764, 1980)。しかしながら、真核生物のミトコンドリア又はクロロプラスト中のrRNAシストロンは実際に原核生物である (Borst and Grivell, Nature 290: 443-444, 1981)。

文献には非常に少数の真核又は原核生物のスペーサー領域の核酸配列しか記載されていない (例えばYoung et al., J. Biol. Chem. 254: 3264-3271, 1979; 及びMartens et al., System. Appl. Microbiol. 2: 224-230, 1987)。これらのデータから核酸配列保存を確実に予想することはできず、従って、特異的プローブの選択のためのスペーサー領域の適応については全く推定することができない。

より詳細には、真核生物に関して、生物学的サンプル中

で微生物の検出に使用され、16S及び23SrRNA遺伝子間のスぺーサー領域から誘導されるハイブリダイゼーションプローブは未だに報告されていない。真核生物の大小サブユニットrRNA遺伝子間の対応するスぺーサー領域についても何ら解明されていない。

真核生物に関する限り、リボソーム遺伝子スぺーサーからクローニングされたフラグメントの使用がLeishmaniaに関する分類学的研究に記載されている(Ramirez and Guevara, Mol. Biochem. Parasitol. 22:177-183, 1987)。しかしながら、使用された領域及び研究のアプローチは、特に以下に述べる理由により、小rRNA及び大rRNA遺伝子間のスぺーサー領域から誘導されるプローブを使用するために当業者には無益である。

(i) Ramirez及びGuevaraにより使用されたリボソーム遺伝子スぺーサーはsrRNA及び1rRNA間のスぺーサー領域ではなく、2つの隣接するrRNAシストロン間に存在する配列であり、このようなスぺーサーは真核生物ではrRNAシストロンの反復単位間にしか見いだされず、srRNA及び1rRNA遺伝子間の内部

pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23SrRNAスぺーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。

本発明の更に別の目的は、ドットスポット、顕微鏡、コンペティション、サンドイッチ又は逆ハイブリダイゼーション試験のようなハイブリダイゼーション試験により生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23SrRNA遺伝子スぺーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。本発明の更に別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のin vitro診断用プローブ及び簡単な診断方法を提供することである。

スぺーサーには無関係である。

(ii) 遺伝子スぺーサーフラグメントを使用するLeishmania分類群間の区別は、制限フラグメントパターンを比較することにより得られ、使用されるフラグメントは非特異的である。

従って、サザンブロット分析を用いずに簡単なハイブリダイゼーションプロトコルを使用してフラグメントで区別することは不可能である。

リボソーム遺伝子スぺーサー中に高特異的のプローブが存在し得るということも立証されていない。

従って、本発明の目的は、細菌種のような特定生物のrRNA遺伝子間のスぺーサー領域から誘導される種特異的のプローブを提供することである。

本発明の別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のin vitro診断用プローブ及び簡単な診断方法を提供することである。

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌のrRNA遺伝子間のスぺーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

本発明はより詳細には、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌のrRNA遺伝子間、特に16S及び23SrRNA遺伝子間のスぺーサー領域の約15ヌクレオチド〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくはスぺーサー領域の約15〜約100ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

以下の文中で「スぺーサー領域」なる用語は、rRNA遺伝子間、より特定のには16S及び23SrRNA遺伝子間のスぺーサー領域から誘導されるDNAプローブに係る。

以下の文中で「スぺーサー領域」なる用語は、rRNA遺伝子間、より特定のには16S及び23SrRNA遺伝子間のスぺーサー領域から誘導されるDNAプローブに係る。

子間のスベーター領域を意味する。

本発明は、検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌に固有であるように選択されたrRNA遺伝子間のスベーター領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブに係り、rRNA遺伝子間のスベーター領域の前記配列は、

一、目的生物のrRNA遺伝子間のスベーター領域のヌクレオチド配列を、最近隣接のrRNA遺伝子間のスベーター領域のヌクレオチド配列と比較し、

二、最近隣接のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスベーター領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスベーター領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくはスベーター領域の約15〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又は

三、短縮スベーター領域を得るように、目的生物のスベーター領域からtRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列

を欠失させ、

四、少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜スベーター領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより選択される。

本発明は特に、rRNA遺伝子間のスベーター領域が16SrRNA遺伝子及び23SrRNA遺伝子間の転写スベーター領域であるようなプローブに係る。

違って概説するように、数種の微生物のスベーター領域をクローニングし、配列決定及び比較した。比較の結果、スベーター領域の核酸配列は高保存性のrRNA遺伝子に比較して半保存性(semi-conserved nature)であることが判明した。従って、スベーター領域はrRNA遺伝子それ自体よりもプローブの開発に好適である。図1、2及び10は、高度に関連する生物(例えば同一遺伝種からの高度に関連する株)間に高度の配列相関性があることを示す。図3及び7に示すように、並の関連性を有する生物間では多少大きい配列相違が認められた。図4〜6に示すように、

関連性の低い種間では顕著な配列相関性は(tRNA配列を除き)全くないことが判明した。

下表では、異なる株の16SrRNA配列の相関値(16S hom)(配列相関%)を、スベーター領域の対応する相関値(スベーターhom)に比較した。相関値(16S hom及びスベーターhom)は、Intelligentics Inc. 及びGenofit SA製PC Geneソフトウェア(1989年4月20日リリース6.01)を使用して計算した。比較したヌクレオチドの総数を括弧内に示す。この結果から明らかなように、スベーター領域は16SrRNA分子よりも低保存性である。

比較株		16S	スベーター
株1	株2	hom	hom
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	99.9%	100%
NCTC 8375	ITC 4367	(1434)	(335)
<i>B. pertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	100%	98.1%
ATCC 10380	NCTC 452	(417)	(582)
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	99%	93.5%
NCTC 8375	NCTC 10025	(1452)	(803)
<i>B. catarrhalis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	97.9%	87.1%
ITC 4197	ATCC 19975	(1244)	(498)
<i>B. pertussis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	88.3%	58.4%
ATCC 10380	NCTC 8375	(998)	(582)
<i>B. catarrhalis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	83.8%	68.1%
ITC 4197	NCTC 8375	(1485)	(498)
<i>E. ducreyi</i>	<i>E. coli</i>	88.3%	67.1%
CIP 541		(1498)	(846)

この結果、関連する対照病原菌(即ち *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella cat*

arrhaliis, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*(株)のスペーサー領域配列から種特異性及び感度の高いアローブを誘導することができた。16S及び/又は23SrRNA分子中で高特異性アローブを見いだすことができなかった*Neisseria meningitidis*及び*Bordetella pertussis*種のスペーサー領域からも有用なアローブを誘導することができた。本明細書に記載する以外の種(例えば他の*Campylobacter*種、他の*Haemophilus*種、*Actinobacillus*種、*Bacteroides*種、*Chlamydia*種等)の特異的アローブも同様にスペーサー領域配列から誘導できる。

16S及び23SrRNA遺伝子間の転写スペーサー領域から誘導されるアローブの強制的は、検出すべき細胞中に存在するゲノムDNA及び前駆体RNA分子である。前駆

体RNA分子は一本鎖であり、多重コピー存在し得るので、前駆体RNA分子を検出すると有利である。他方、DNA分子はRNA分子よりも酵素分解に非常に受けにくい。従って、ハイブリダイゼーション前にRNA分解を生じないように十分に生物学的サンプルを処理及び/又は保存できない場合には、DNAターゲッティングが好適である。

16S-23SrRNA転写スペーサー領域から誘導されるアローブの別の利点は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する酵素増幅後に強制的検出する点にある。多くの微生物のスペーサー領域は例えば、夫々16S及び23SrRNA遺伝子の3'末端及び5'末端の保存領域に割り当てられた同一プライマーを使用して酵素的に増幅され得る。rRNA遺伝子の高保存性を利用すると、同一試験及びアロトコルを使用して好適には同時に多数の生物のスペーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスペーサー領域に特異的にターゲッティングするアローブを使用して増幅フラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントの同時且つ特異的検出のために有利な方法は、逆ハイブリダイゼーションである。

スペーサー領域は保存配列により交叉されているので、

この領域をPCR技術によりクローニング及び配列決定するのは簡単であり、同一アロトコルを多種の生物に適用することができる。従ってスペーサー領域の配列は、16S又は23SrRNAに割り当てられた保存プライマーを使用するrRNA遺伝子の酵素的増幅により得られる。スペーサー領域を占めるフラグメントの増幅に使用可能な塩基プライマー対の例を以下に挙げる。

プライマー対1: TGGCTCAGAT TGAACGGTCG CGGC及び

CCTTTCCTTC ACGGTAETGG T

プライマー対2: TGGCTCAAGT CCTAACAGG TA及び

CACGTCCTTC GTCCCTC.

増幅したフラグメントをそのまま、又は固有制限部位を認識する制限酵素で消化後に2つのサブフラグメントとしてクローニングすることができる。M13でPCR産物をクローニングするためのストラテジーは、Medison et al. (Gene 71: 491-499, 1988)に記載されている。

同一ストラテジーを使用してプラスミドベクターでクローニングすることができる。このアプローチによると、塩基プライマーの5'末端から固有制限部位を含むヌクレオ

チド配列を伸長させ、フラグメントを順方向にクローニングする。プラスミドベクターにクローニング後、ジデオキシチエンターミネーション法を使用してスペーサー領域を配列決定することができる。

このアプローチはゲノムバンク又は選択された制限エンドヌクレアーゼフラグメントを使用する従来のクローニング手順に比較して著しく簡単で時間がかからない。

クローニングせずにPCRフラグメントで配列決定反応を直接実施すると、より迅速に配列情報が得られるが、クローン化フラグメントから生成された配列情報のほうがより正確且つ完全である。PCRフラグメントに比較して、クローン化遺伝子フラグメントは容易に大量複製できるので、配列決定段階を明確に読み取ることができる。アローブ配列中に1つでもミスマッチがあるとアローブは無効になるので、配列を得る際には速度よりも精度のほうが著しく優先される。

上記に要約したアプローチによりスペーサー配列を得る容易さを考慮すると、アローブが所望される生物のスペーサー領域のヌクレオチド配列を最近開種のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較するのが、特異的アローブ配列

を誘導するために好適な方法である。

最近隣種とは、DNA相同の点で最も密接に関連することが知られており且つ該当生物と区別されなければならない分類群を意味する。

該当生物の分類学的位置に依存して、最近隣種は該当生物に非常に高度に関連し、結合度が75%以上であってもよいし、関連度が低く、有効なDNA相同百分率を示さなくてもよい。初期再生レート法では結合度の値は約30%以下であり、面相DNA:DNAハイブリダイゼーション法ではDNA相同は更に低く、10~20%の結合度になる。

一方、該当生物を区別すべき最近隣種のヌクレオチド配列を手でできない場合には、試行錯誤により特異のプロープを選択することができる。その場合、スペーサー領域の任意の場所に位置し得る特異のプロープ領域を各生物毎に実験的に定数しなければならぬ。tRNA遺伝子やシグナル配列のようなスペーサー領域中のほんのわずかの領域しかプロープ領域として先験的に除外できない場合もある。しかしながら、16S-23SrRNAスペーサー領域は一般に小さく、通常900bp以下であるので、大規模に

スクリーニングしなくても良好なプロープ配列を容易に見いだすことができる。

例えば16S及び23SrRNA遺伝子間の700bpのスペーサー領域の場合、tRNA及びシグナル配列を欠失させることにより得られる「短縮」スペーサー領域は約500bpであり得る。

本明細書中に使用する「生物学的サンプル」なる用語は、該当種の配列が探索される臨床サンプル（腫瘍、痰、血液、尿等）、環境サンプル、細菌コロニー、汚染又は純粋培養物、複製複製等のような試料を意味する。

本明細書中に使用する「rRNA遺伝子スペーサー領域から誘導」なる用語は、該当プロープがDNAフラグメントから形成されるかRNAフラグメントから形成されるかに関係なく、又はクローン化フラグメント（DNAの場合）から形成されるか又は合成オリゴヌクレオチドから構成されるかに関係なく、該当プロープがゲノム又は転写RNA分子中に通常存在するリボソームRNA遺伝子間のスペーサー領域に配置された配列とハイブリダイズすることを意味する。

Neisseria gonorrhoeae 株を検出

するための本発明のハイブリダイゼーションプロープは、

一核酸グループ:

グループNC11:

CCATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NC11
GCGAAGTAGA ATAACCACCC ATCG	NC11C
GCGAAGUAGA AGAACCACGC AUCG	NC11CR
CGAUGCGUCC UUAUUCUACU UCGC	NC11R

グループNC12:

TTCTTTTACC TACCCCTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NC12
GTTTGCCTAC TTAGCTCAACG GGTACCTAAA CGAA	NC12C
GUUUGCUUAC UAGGCAACG GCUAGCUAAA CGAA	NC12CR
UUGGCUUACC UACCCGUGCA CUAAGUAAGC AAAC	NC12R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

一、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

一、前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換さ

れているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Neisseria meningitidis 株を検

出するための本発明のハイブリダイゼーションプロープは、

一核酸グループ:

グループNM11:

GCTCAAGTCT CACCTCGCCC TC	NM11
CACGGCGACG TCACACTTGA CC	NM11C
CACGGCGACG UCACACUUGA CC	NM11CR
CGUCAAGGCU GACGUGCCCC UC	NM11R

グループNM12:

GTTCTTGGTC AAGTGTACG TC	NM12
GACGTACAC TTGACCAAGA AC	NM12C
GACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NM12CR
GUUCUGGUC AAGGUGACG UC	NM12R

グループNM13:

GCGTTGCTTA TAGCTATCTA CTCTGC	NM13
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NM13C
GCACAGUAGA UAGCUAUAAC CAACGC	NM13CR

CCGCUCCGUA UAGCUAUCUA CUCUCC

NM13R

グループNM14:

TGGCTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTCCA

NM14

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACCCA

NM14IC

UGCACAGUAG AUAGCAUAU CGAACCCA

NM14ICR

UCCGUUCCAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA

NM14R

グループNM15:

TTTTTCTTCTTGTCAAGTCTGACCTCGCCCTGAATGCGATTCTGTTCCATT

NM15

AATCGAACAGAAATCCATTTCAGCGCGAGCTCAGACTTACCAAGCAACAAAA

NM15IC

AAUGGAACAGAAUCCAUUACGGCGAGCUCACACUUGACCAAGCAACAAAA

NM15ICR

UUUUGUUCUUGCCUACAGUCUGAGCUGCCCGCAUUGGAUUCUGUCCAUU

NM15R

グループNM16:

TTTGCCCTAAC ATTCGCTTCA CTAGAACATC AGAC

NM16

CTCTGATGTT CTACTCAAGC GAATCTTACG CAAA

NM16IC

CUCUGAUGU CUAGUCAAGC GAAUGUAGG CAAA

NM16ICR

UUUCCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAU CAGC

NM16R

グループBC12:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA

BC12

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

BC12IC

UCCACCAAGC AAGUUDAAAC AUCAA

BC12ICR

UUGAUGUUA AACUUGCUG CUGGA

BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Haemophilus ducrovii株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、

一核酸グループ:

グループH911:

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Branhamella catarrhalis株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、

一核酸グループ:

グループBC11:

TTAAACATCT TACCAAG

BC11

CTTTGCTAAG ATGTTTAA

BC11IC

CUBUGUAG AUGUUA

BC11ICR

UUAACAUCU UACCAAG

BC11R

TTATTATGCC CGAGGCATAT TG

H911

CAATATGCCCT CGGCCATAAT AA

H911IC

CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA

H911ICR

UUAUUAUGCG CGAGGCAUUA UG

H911R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Haemophilus influenzae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、

一核酸グループ:

グループH111:

ACGCATCAAA TTCACCGCAC TT

H111

AAGTCCCGTC AATTTGATGC GT
AAGCCCGGUC AAUUGAUGC GU
ACCCAUCAAA UGACCCGAC UU
グループH112:
ACTTTGAAGT GAAAACTTAA AG
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT
CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU
ACUUUGAAGU GAAACUAAA AG

H111C
H111CR
H111R
H112
H112C
H112CR
H112R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・ 矢々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・ 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む、

Bordetella pertussis株を検出す

ブは、

ー核酸グループ:

グループSP11:

CTCAGACATC ACCAAGTAAT GCA
TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC
UGCAUUAUUU GUGAUCUUU CAC
GUGAGAGAUU ACCAAGUAAU GCA

SP11
SP11C
SP11CR
SP11R

グループSP12:

AGCAACTGCC CATTGCTCTT
AAGACCAATG CGCAGTTCCT
AACAACCAUG CGCAGUCCU
AGCAACUGCG CAUUGGUCUU

SP12
SP12C
SP12CR
SP12R

グループSP13:

GAGTTTATCA CTCAAAAGTC AGAA
TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC
UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC
GAGUUUAUCA CUGAAAAGUC AGAA

SP13
SP13C
SP13CR
SP13R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾

るための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、

ー核酸グループ:

グループBP11:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GCCTT
AAGCCTCTCC AGAGGATCGG TGTGG
AAGCCUGUCC ACAGGAUGGG UCUGG
CCACACCCAU CCUCUGGACA GCGUU

BP11
BP11C
BP11CR
BP11R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・ 矢々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・ 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む、

Streptococcus pneumoniae株
を検出するための本発明のハイブリダイゼーションアロー

配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・ 矢々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・ 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む、

Streptococcus agalactiae株
を検出するための本発明のハイブリダイゼーションアロー

ー核酸グループ:

グループSA11:

AATCGAAAGG TTCAATTGT T
AACAATTGCA ACCTTTGGAT T
AACAADUUGA ACCUUCUCCAU U
AAGCGAAAGG UGCAAAUUGU U

SA11
SA11C
SA11CR
SA11R

グループSA12:

CGAAACCTGC CATTTGCCTC TT
AAGACGCCAA TGGCAGCTTT CC

SA12
SA12C

AACACGCAAA UGGCAGGUU CC	SAI21CR
GGAACCCUGC CAUUUCCGUC UV	SAI2R
グループSAI3:	
TCCACCATCT AGAAATAGAT TGTAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCCTGGA	SAI3IC
UUUCACAAUC UAUUUUACA UCCUGCA	SAI3ICR
UCCACGAUCU ACAAUAGAU UCUACAA	SAI3R
グループSAI4:	
TCTACTTTTA ACAAACCTAG GTT	SAI4
AACCTAGTTT CTTTAAACT ACA	SAI4IC
AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA	SAI4ICR
UCUACUUUUA ACAAACUAG CUU	SAI4R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換さ

れているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

本発明は更に、適切な条件でプローブが Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 由来のDNA及び/又はRNAと特異的にハイブリダイズするという条件下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から誘導される15〜最大数のヌクレオチドの配列、又はTがUで置換された対応配列、又はその相補配列、又はTがUで置換された対応する相補配列を含む Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するためのハイブリダイゼーションプローブに係る。

グループNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4に示した配列中、アルファベットは以下のヌクレオチドを表す。

A: アデニル残基

C: シチジル残基

G: グアニジル残基

T: チミジル残基

U: ウラシル残基。

「鎖的」なる用語は、上記に定義したグループNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4の配列のいずれかに相補的な配列を意味する。

本発明のプローブが上記配列の片側又は両側に核酸延長部(例えばクローニングベクターの核酸フラグメント又は該クローニングベクターから前記プローブを切断することにより得られるリンカーフラグメント)を含む場合、このような延長部は、追って定義するような本発明の方法により試験され得る微生物のDNA中で上記鎖的以外の任意の対応する相補的核酸配列とハイブリダイズしないように選択されるべきである。このようなハイブリダイゼーションは寄生性であり、プローブの特異性を低下させる。好適プローブは、上記グループの配列のいずれかから形成される

核酸フラグメントから構成され、該フラグメントは15〜該当核酸配列の最大数のヌクレオチドを含む。

上記ヌクレオチド配列(及び以下に記載する他の配列)において、式の左端は常に該当配列の5'末端に対応し、右端は3'末端に対応する。

更に「グループXのプローブ」(XはNGI1, NGI2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4から選択される)と称するとき、このようなプローブは上記又は下記に定義するグループに属する核酸の1種に含まれる配列を有するものと理解されたい。

また、本明細書中で使用する「ヌクレオチド」なる用語は、特に明記しない限りリボヌクレオチド及びデオキシヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド(例えばイノシン)を無差別に意味するものと理解されたい。「ヌクレオチド」なる用語は更に、修飾基(例えばハイブリダイゼーション能に根本的に影響しない化学的修飾基)を含むヌクレオチドも包含する。このような修飾基の目的は、例えば特に該当

RNA又はDNA鎖（例えば他のDNA及び／又はRNAと共に生物学的サンプル中に最初に含まれているRNA又はDNA鎖）とのハイブリダイゼーション産物中から標識又はラベルされたアプローブを後で検出するために適切なマーカー又はラベルと直接又は間接的に結合し易くすることである。

例えば、このような修飾基は、適切な酵素又は蛍光又は化学発光ラベルを担持する他の抗体により特異的に認識され得る抗体により認識可能である。可能な標識手順については後で詳細に説明する。

本発明は更に、上記配列のいずれかを有しており且つ上記アプローブの特異性を変更しないように一部のヌクレオチドが置換したアプローブにも係る。アプローブは、上記グループのいずれかに属する核酸の1種又はその一部から構成される場合もあるが、その場合、アプローブはNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniaeもしくはCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliの天然RNA又はDNAに含まれる配列に

相補的な配列（数字のみ又は数字の後にRを記述することにより表す）から形成されるアプローブを提供する。

Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の遺伝材料に対する該アプローブとの特異性を減えない程度までその両側にヌクレオチド延長部を含む。

従って本発明は、場合によりヌクレオチド配列に少数の些少の変異を有するほとんどのNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniaeもしくはCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliのRNA又はDNAに含まれる配列のヌクレオチド配列からなるレプリカ（数字の後にIC又はICRと記述することにより表す）、又はNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meni

より詳細には、該当DNA中の標的配列は、このような標的に対する本発明のアプローブのハイブリダイゼーション特異性に影響しないように、場合により株間に些少な天然の変異を有するNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の全部ではないとしても大部分に存在する以下の連続配列のいずれかから構成される。

Neisseria gonorrhoeaeの場合、

CCGAAGTAGA ATAACGACCC ATCG

CTTTCCTTAC TTACTCAACC GGTACGTAAA CGAA.

Neisseria meningitidisの場合、

CAGCGGCGACG TCACACTTGA CC

CACCTCACAC TTGACCAAGA AC

GCACAGTAGA TACCTATAAC GAACCC
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACCCA
AATGGAACACAATCCATTCCAGGCGACGTCACACTTCACCAGAACAAAA
GTCTGATCTT CTAGTCAACG CAATCTTAGG CAAA.

Branhamella catarrhalis の場合、

CTTTCCTAAG ATCTTTAA
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA.

Haemophilus ducreyi の場合、
CAATATCCCT CGCGCATAAT AA.

Bordetella pertussis の場合、
AAGCCTGTCC ACAGCATGCC TGTCG.

Haemophilus influenzae の場合、
AAGTGGCGTC AATTTCATGC GT
CTTTAAGTTT TCACCTCAAA GT.

Streptococcus pneumoniae の場合、
TGCATTACTT CCGATCTCT CAC
AACACCAATG CCGAGTTCCT
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC.

ococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための方法にも係り、該方法は、必要に応じて適切な変性条件下で核酸 (DNA 又は RNA) をハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプローブと接触させる段階と、ハイブリッドが形成された場合にはこれを検出する段階とを含む。

本発明の方法は、該当生物を検査するサンプル中に存在する可能性のある酵母、真菌、原生動物、他の細菌株及び／又はヒト細胞から、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter j

Streptococcus agalactiae の場合、

AACAATTTGA ACCTTTCCAT T
AAGACCCAAA TGGCAGCTTT CC
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGA
AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA.

本発明のプローブは、対応するヌクレオチド配列を含むインサートを含む組換えプラスミドをクローニングし、必要に応じて適切なヌクレアーゼを使用してクローン化プラスミドから対応するヌクレアーゼ配列を切断し、例えば分子量に依る分離により回収することにより形成され得る。本発明のプローブは、例えば従来のホスホートリエステル法により化学的に合成することもできる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Strept

e jejuni 及び Campylobacter coli を、区別することができる。本発明の方法は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株をサンプル中で直接又は株を培養後に検出する方法に係る。

ハイブリッドが検出された場合、グループ NGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3 及び SAI4 のプローブのいずれかの使用中に夫々 Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis

s. Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae及びStreptococcus pneumoniaeによる感染が生物学的サンプル中に存在していたと判断することができる。

本発明の有利な実施態様によると、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法において、使用されるプローブは、生物学的サンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus

ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA全体及びRNAとハイブリダイズするプローブである。

ハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイゼーション温度、媒体の成分の性質及び濃度、並びに形成されるハイブリッドの洗浄温度等の数個のパラメーターに依存して監視され得る。

ハイブリダイゼーション及び洗浄温度はプローブ（その核酸組成、種類及び長さ）に応じて上限を制限され、本発明のプローブの最高ハイブリダイゼーション又は洗浄温度は約30～58℃である。温度がこれ以上になると、デュアレクシングはプローブと標的との間に形成されるハイブリッドの解離（又は変性）に適合する。

好適ハイブリダイゼーション媒体は約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH

7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有する。

好適洗浄媒体は、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオンホルムアミドを含有する。他のハイブリダイゼーション又は洗浄媒体も使用できる。

しかしながら、プローブ又は媒体に変異を導入する場合、必要な特異性を得るためにプローブを使用可能な温度は、B. D. HAMES and S. J. HIGGINS, (eds.), *Nucleic acid hybridization. A practical approach*, IRL Press, Oxford, U. K., 1985に記載されているような既知の関係に応じて変更すべきである。

この点では、一般にDNA:DNAハイブリッドはRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドよりも安定性が低いことにも留意すべきである。従って、検出すべきハイブリッドの性質に依存して、特異的検出を実施できるようにハイブリダイゼーション条件を適応させるべきである。

本発明に従って、一般にNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法は、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値にハイブリダイゼーション温度を適宜調節することにより実施され得る。このような場合、より厳密な条件で洗浄する必要はない。

本発明の別の実施態様によると、ハイブリダイゼーション温度を必ずしもハイブリダイゼーションが特異的となるような値に調節する必要はなく、特に、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値に対応する温度で洗浄を実施するのであるならば、ハイブリダイゼーションが特異的となるような温度よりも低い温度でハイブリダイゼーションを行ってもよい。

グループNGI1のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNGI2のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI1のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI2のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBCI1のプロープでBranhamella catarrhalis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約30℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBCI2のプロープでBranhamella catarrhalis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約42℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBPI1のプロープでBordetella pertussis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHDI1のプロープでHaemophilus ducreyi株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI3のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI4のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約48℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI5のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約58℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI6のプロープでNeisseria meningitidis株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII1のプロープでHaemophilus influenzae株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII2のプロープでHaemophilus influenzae株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI1のプロープでStreptococcus agalactiae株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI2のプロープでStreptococcus agalactiae株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI3のアローブでStreptococcus agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI4のアローブでStreptococcus agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約37℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI1のアローブでStreptococcus pneumoniae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI2のアローブでStreptococcus pneumoniae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

-Neisseria gonorrhoeaeに特異的なアローブ、即ちグループNGI1又はNGI2のアローブと、

-これらのアローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にBranhamella catarrhalis株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記Branhamella catarrhalisに特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグループBCI1又はBCI2のアローブと、

-これらのアローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

グループSPI3のアローブでStreptococcus pneumoniae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

本発明は更にNeisseria meningitidis株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-Neisseria meningitidisに特異的なアローブ、即ちグループNMI1、NMI2、NMI3、NMI4、NMI5又はNMI6のアローブと、

-これらのアローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にNeisseria gonorrhoeae株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にHaemophilus ducreyi株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記Haemophilus ducreyiに特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグループHDI1のアローブと、

-これらのアローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にBordetella pertussis株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記Bordetella pertussisに特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグループBPI1のアローブと、

-これらのアローブとBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリ

リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Haemophilus influenzae 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記 Haemophilus influenzae に特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループHII1又はHII2のプローブと、
- これらのプローブと Haemophilus influenzae 株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Streptococcus agalactiae 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記 Streptococcus agalactiae

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli に特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブと、
- これらのプローブと Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプローブは、核酸プローブを利用するアッセイの特異性を増加するサンドイッチハイブリダイゼーションシステムで使うことができる。核酸プローブに基づくアッセイにおけるサンドイッチハイブリダイゼーションの原理及び使用は既に記載されている(例えばDUNN a

eに特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループSAI1, SAI2, SAI3又はSAI4のプローブと、

- これらのプローブと Streptococcus agalactiae 株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Streptococcus pneumoniae 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記 Streptococcus pneumoniae に特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループSPI1, SPI2又はSPI3のプローブと、
- これらのプローブと Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

nd HASSEL, Cell, 12: 23-36; 1977; RANKI et al., Gene, 21: 77-85; 1983)。直接ハイブリダイゼーションアッセイは好ましい速度を有するが、サンドイッチハイブリダイゼーションは信号対雑音比が高いという点で有利である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーションは核酸プローブに基づくアッセイの特異性を増加することができる。

適正に設計するならば、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは真陰性、同一生物の2種の異なる核酸部分を認識する2種のプローブを使用する場合、核酸プローブに基づく試験の特異性を最大にすることができる。満足しなければならない唯一の要件は、2種のプローブの両方が(1)標的生物の同一核酸分子にハイブリダイズし、且つ(11)同一の非標的生物にハイブリダイズしないことである。

2種の所与のプローブI及びIIを使用する場合、サンドイッチハイブリダイゼーションシステムは次のように説明することができる。

プローブIは生物(Cでなく)A及びB由来の核酸とハ

イブリダイズする。

プローブIIは生物(Bでなく)A及びC由来の核酸とハイブリダイズする。

両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズすることが絶対的に必要であるので、生物A由来の核酸がサンプル中に存在する場合のみに検出可能なシグナルが発生される。プローブの一方が検出すべき生物に特異的である場合には、他方のプローブは第1のプローブよりも同一標的分子にハイブリダイズするのであれば、特異的配列から構成しても非特異的配列から構成してもよい。

本発明のプローブは、同一標的分子にハイブリダイズする別の非特異的又は特異的プローブと夫々組み合わせて Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli に特異的なサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイで使用する。サンドイッチハイブリダイゼーションプロセスでは、標的DNA又はRNAを探索する生物学的サンプルにプローブを同時に加えてもよいし、別々に加えてもよい。

本発明は更に生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Neisseria gonorrhoeae に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Neisseria gonorrhoeae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Neisseria meningitidis に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Neisseria meningitidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus ducreyi に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus influenzae に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Haemophilus influenzae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus influenzae に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Haemophilus influenzae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Neisseria meningitidis に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Neisseria meningitidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Branhamella catarrhalis に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus ducreyi に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

これらのプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus influenzae に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus infiuensae に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、
- これらのアローブと Haemophilus infiuensae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Bordetelia pertussis 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Bordetelia pertussis に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、
- これらのアローブと Bordetelia pertussis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Streptoccoccus pnemoniae に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Streptoccoccus pnemoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Campyilobacter jeiuni 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Campyilobacter jeiuni に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、
- これらのアローブと Campyilobacter jeiuni 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Streptoccoccus agalactiae 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Streptoccoccus agalactiae に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、
- これらのアローブと Streptoccoccus agalactiae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Streptoccoccus pnemoniae 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Campyilobacter coii 株を in vitro 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Campyilobacter coii に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、
- これらのアローブと Campyilobacter coii 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のアローブは、コンペティションハイブリダイゼーションプロトコルでも使用することができる。

コンペティションハイブリダイゼーションでは、標的分子は特異のアローブとその補体との間に形成されるハイブリッドに結合する。標的数が多ければ多いほどアローブと

その補体との間に形成されるハイブリッドの量は少なくなる。特異的標的が存在していたことを示す陽性シグナルは、標的を加えなかったシステムと比較してハイブリダイゼーション反応が低いことにより確認される。特定の實施形態によると、適切に標識した特異的オリゴヌクレオチドプローブを標的分子とハイブリダイズさせる。次に、混合物を受容器（例えばマイクロタイター皿のウェル）に移し、特異的プローブに相補的なオリゴヌクレオチドを固定し、ハイブリダイゼーションを続ける。洗浄後、相補的オリゴヌクレオチドとプローブとの間に形成されたハイブリッドを、使用したラベルに応じて好ましくは定量的に測定する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、酵素的に増幅した特異的フラグメントを生成するためにポリメラーゼ鎖反応技術（PCR; Mullis and Faloona, Methods in Enzymology 155:335-350, 1987）で増幅プライマーとして及び／又は夾叉オリゴヌクレオチドプライマー間で増幅されたフラグメントを検出するためのプローブとして使用することができる。

PCRによるハイブリダイゼーションアッセイの特異性

イゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出する。

増幅が必要な場合、その目的は標的配列を増幅し（それによって標的配列の夾叉領域も増幅させ）、増幅領域のみを標識することである。

生物学的サンプル中に十分な標的配列が存在する場合、増幅は不要である。

このような場合、ハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段により又は特異的染料の添加により標識を実施すべきであり、生物学的サンプル中に存在するDNA及び／又はRNA全体を標識することに留意すべきである。

本発明は更に、生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に in situ 検出するためのキットに係り、該キットは、

- 検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした本発明のプローブの少なくとも1種と、
- 該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの

は種々のレベルに調節することができる。

増幅法又は検出法又はその両方は特異的であり得る。両方が特異的な場合は特異性が最大になるので好適である。このようなPCRを利用する高特異性試験は本発明のプローブを使用して実施され得る。

しかしながら、場合によっては、多様な生物に使用できるように増幅法を標準化するために、特異的検出に結び付けられた本発明の検出プローブを夾叉する保存性プライマーを使用する非特異的増幅法が有利である。

標準化増幅法で使用される増幅プライマーは、スベーター領域の両側の16S及び23SrRNA遺伝子の保存領域に見いだされる（實施例1参照）。

本発明は更に、検出すべき微生物に特異的な本発明のプローブのいずれかを使用して生物学的サンプルに含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に in situ 検出するための方法にも係り、該方法によると、好ましくはプローブ領域を夾叉する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（標的配列を含む）DNA及び／又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプローブとの特異的ハイブリ

酵素的増幅を同時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと検出すべき微生物のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを同時検出するための手段とを含む。

上記方法及びキットは、Saiki et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234, 1989) により記載されている逆ドットプロットアッセイのような逆ハイブリダイゼーションドットプロットアッセイを含む。

この場合、5' ビオチニル化プライマーを用いるPCRを使用して標的配列をまず酵素的に増幅する。第2段階では、固体支持体に固定した特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション後、増幅産物を検出する。この方法は實施例2に記載する変形方法のような数種の変形が考えられる。例えば、この方法はスベーター領域を夾叉する普遍的プライマーを用いるPCR、及び該微生物の種々の特異的オリゴヌクレオチドプライマーをドットスポットし

な順とのハイブリダイゼーション後に特定の臨床サンプル中に存在し得る種々の微生物の同時且つ特異的検出に特に有利であり得る。上記のような逆ハイブリダイゼーションアッセイで使用可能な特異的オリゴヌクレオチドプライマーの有利なパネルの例を以下に挙げる。

(i) 痰パネル: Moraxella(Branhamella) catarrhalis

Streptococcus pneumoniae

Haemophilus influenzae

(ii) CSF - パネル: Neisseria meningitidis

Haemophilus influenzae

Streptococcus pneumoniae

(iii) 尿生殖 - パネル: Neisseria gonorrhoeae

Haemophilus ducreyi

Chlamydia trachomatis

Treponema pallidum

当然のことながら、これらのパネルは他の臨床的に関連する微生物のプロープを加えることにより拡張することができる。歯周ポケットからのサンプル又は血液サンプルのような他の臨床サンプルのパネルも利用できる。

PCRには、非普遍的に保存されたプライマー、例えば

スベーター領域配列から、高度に関連する Bordetella 種の同時検出に有用であり得るプロープを設計することができる。 Bordetella pertussis 以外の Bordetella 種を検出するプロープも図2の配列から推定することができる。同様に、 Moraxella nonliquefaciens 及び Haemophilus influenzae バイオグループ aegyptius の潜在的に特異的なプロープも夫々図7及び8に示すスベーター配列から推定することができる。

スベーター領域自体に配置されたプライマーも使用することができ、PCRは1組のプライマーを用いて又は同一反応容器で種々の組のプライマーを用いて実施することができる。

増幅段階なしに逆ハイブリダイゼーションを実施することもできる。この場合、サンプル中に存在する核酸をハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段又は特異的染料の添加により特異的又は非特異的に核酸又は修飾すべきである。

ほとんどの場合、スベーター領域から誘導され得る該当生物の特異的アローブの数は、本明細書に記載するアローブに制限されない。

生物によっては、種々の細菌の高特異性且つ高感度のアローブの開発のためにスベーター領域を利用できることが立証されているアローブは1又は2種しか記載されていない。 Bordetella pertussis のみが例外であり、スベーター領域の唯一の特定領域 (Bordetella pertussis 配列中のヌクレオチド271~299、図2の上段) が特異的配列を有する。しかしながら、 Bordetella pertussis の

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の Neisseria gonorrhoeae 株を in vitro 検出するためのキットに係り、該キットは、

- 固体支持体に固定された Neisseria gonorrhoeae に特異的な本発明のアローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

- 該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を連時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び/又は前記アローブと Neisseria gonorrhoeae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の Neisseria meningitidis 株を in vitro 検出するためのキットに係り、該キットは、

- 固体支持体に固定された Neisseria meningitidis に特異的な本発明のアローブのいずれか

から選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープと *Neisseria meningitidis* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の *Haemophilus ducreyi* を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定された *Haemophilus ducreyi* に特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープと *Haemophilus ducreyi* 株のDNA及び/又

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の *Bordetella pertussis* 株を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定された *Bordetella pertussis* に特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープと *Bordetella pertussis* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の *Haemophilus influenzae* 株を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定された *Haemophilus influenzae* に特異的な本発明のプロープのいずれか

はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の *Branhamella catarrhalis* 株を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定された *Branhamella catarrhalis* に特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープと *Branhamella catarrhalis* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

から選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープと *Haemophilus influenzae* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の *Streptococcus pneumoniae* 株を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定された *Streptococcus pneumoniae* に特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

-該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープと *Streptococcus pneumoniae* 株のDN

A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

一固体支持体に固定されたStreptococcus agalactiaeに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

一該プロープの順的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

のラベルを使用することができる。プロープは、 ^{32}P 、 ^{33}S 、 ^{125}I 、 ^3H 及び ^{14}C のような放射性トレーサーにより標識され得る。

放射性標識は、(標識すべき末端に応じて)放射性標識ヌクレオチド、(ホスファターゼによる脱リン酸化を伴うか又は伴わない)ポリヌクレオチドキナーゼ、末端転移酵素又はリガーゼを使用することにより、3'又は5'位の末端標識のような任意の従来方法に従って実施され得る。本発明のプロープの1種は、数種の放射性ヌクレオチド又は数種の放射性及び非放射性ヌクレオチドから構成される順的合成用マトリックスであり得る。

本発明のプロープは、1又は数種の放射性ヌクレオチドを使用する化学的合成により製造することもできる。別の放射性標識方法は本発明のプロープの化学的ヨウ素化であり、プロープに数個の ^{125}I 原子を結合させる。

本発明のプロープの1種が非放射性RNA又はDNAとのハイブリダイゼーションに使用するように放射性標識される場合、ハイブリダイゼーションの検出方法は、使用される放射性トレーサーに依存する。一般に、放射性トレーサーにより発生される電離性放射線を検出することが可能

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

一固体支持体に固定されたCampylobacter jejuniに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと及びCampylobacter coliに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

一該プロープの順的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素増幅が可能であり及び/又は前記プロープとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

プロープの使用条件

本発明のプロープは標識すると有利である。任意の従来

なオートラジオグラフィ、液体シンチレーション、 γ 計数又は他の任意の従来方法を使用することができる。

免疫特性(例えば抗原又はハプテン)、ある種の試薬に対する特異的親和性(例えばリガンド)、検出可能な酵素反応を提供する特性(例えば酵素、補酵素、酵素基質又は酵素反応に関与する基質)、又は物理的特性(例えば任意の波長の光の蛍光、発光又は吸収)を有する標識に本発明のプロープを組み合わせるにより非放射性標識を使用することもできる。プロープと標識とにより形成されるハイブリッドを特異的に検出する試薬も使用できる。

本発明のプロープを化学的に合成する場合には非放射性ラベルを使用することができ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン及びウラシル残基は、プロープ又はプロープと相補的DNAもしくはRNAフラグメントとの間に形成されたハイブリッドを検出することが可能な他の化学的残基に結合し得る。

一方、1種以上のヌクレオチドを他の化学的残基に結合することにより修飾した場合、プロープのヌクレオチド配列は本発明のプロープの1種のヌクレオチド配列と同一である。

本発明は更に、上記のように標識され且つ検出可能な本発明のプロープを使用してハイブリダイゼーションによりRNA及び／又はDNAを検出するための方法にも係る。この点では、従来のハイブリダイゼーション方法を使用することができる。

生存生物起源の細胞又はそれ自体生存生物である細胞を検出するためには、化学的又は物理的方法を使用して細胞の部分的又は全溶解によりこれらの細胞のRNA及び／又はDNAに必要に応じてアクセスできるようにし、検出可能な本発明の1又は数個のプロープと接触させる。この接触は、液体媒体又は溶液中でニトロセルロース、セルロース又はナイロンフィルターのような適当な支持体上で実施され得る。この接触は、次善、最適又は制限条件（即ち配列が所定の分子長で完全に相同である場合にのみハイブリッド形成可能な条件）下で実施され得る。このような条件は、温度、反応物質濃度、最適核酸対合温度を低下させる物質の存在（例えばホルムアミド、ジメチルスルホキシド及び尿素）、及び反応容量を外見上低下させるか及び／又はハイブリッド形成を促進する物質の存在（例えばデキストラン硫酸、ポリエチレングリコール又はフェノール）を含む。

一般に、異種DNAの存在が該当用途でプロープの特異性を損なわないならば、クローニングを可能にする組換えDNA中に本発明の種々のプロープを含むこともできる。

（以下余白）

ハイブリダイズしなかった本発明のプロープを除去するには、適切なイオン力価及び適切な温度の緩衝溶液で洗浄し、場合により、S1ヌクレアーゼ又は一本鎖DNAもしくはRNAを消化するが、DNA-RNAハイブリッドもしくは二本鎖DNAを消化しない他の任意の酵素で処理する。

液体媒体中で、細胞DNA又はRNAフラグメントに對合した本発明のプロープのハイブリッドは種々の方法、例えばヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィーにより液体媒体の残余から分離することもできる。

次に、ハイブリダイズしたプロープをプロープ上のラベルにより検出する。

染色体DNAフラグメントを標的にするためには、RNAを1又は数種の酵素で処理し、DNAフラグメントを变性（即ち両鎖を分離）した後、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプロープの1種をDNAフラグメントと接触させ、ハイブリダイゼーションの終了に達するために必要な時間後、ハイブリダイズしなかったフラグメントをハイブリダイズしたフラグメントから分離し、細胞検出について上述したようにラベルを検出する。

図1～図10には、種々の微生物中で発見されたスパーサー領域のアライメント（全部または一部を配列したもの）が例として示されている。対（match）及び空所（gap）は各々、 、 及び“-”で表されている。総ての配列に関して、非コードストランドは、その5'-3'配列で示されている。

5'末端は、16S rRNA遺伝子の近位であり、3'末端は、23S rRNA遺伝子の近位である。

図1～図10に参照される各生体（*E. coli*の1種を除く）の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスパーサー領域の各核酸配列は、新規であることは指摘されねばならない。

図1には、*Neisseria gonorrhoeae*株 NCTC 8375（上列）及び ITM 4387（下列）の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスパーサー領域の16S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

図2には、*Bordetella pertussis* ATCC 10980（上列）及び *Bordetella bronchiseptica* NCTC 452（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスパーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図3には、*Neisseria meningitidis* NCTC 10025（上列）及び *Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375（下列）の16Sと23S

rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図4には、*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375(上列)及び*Bordetella pertussis* ATCC 10380(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図5には、*Branhamella catarrhalis* ITM 4197(上列)及び*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図6には、*Haemophilus ducreyi* CIP 542(上列)及び*Escherichia coli*(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図7には、*Branhamella catarrhalis* ITM 4197(上列)及び*Moraxella nonliquefaciens* ATCC 19975(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図8には、*Haemophilus influenzae*(バイオグループ *influenzae*) NCTC 8143(上列)及び*Haemophilus influenzae*(バイオグループ *scropting*) ITM 859(下列)の18Sと23S

rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図9には、*Streptococcus pneumoniae* S90-5122(上列)及び*Streptococcus agalactiae* U90-2817(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図10には、*Campylobacter jejuni* ATCC 33560(上列)及び*Campylobacter coli* ATCC 33559(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の23S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

使用した株は、各々増殖コレクション:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France.

ITM: Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

NCTC: National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom.

から入手し得る。

以下の実施例は、本発明のプロープの製造法及び種々のハイブリダイゼーションプロトコルを使用するプロープの

特異性及び感度に関する実験結果に関する。臨床に適當な以下の生体: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*及び*Bordetella pertussis*を選択した。

実施例は、種-特異性で感度の高いプロープが、研究した全ての生体のスペーサー領域に容易に知見されたことを示している。さらに、種-特異性で感度の高いプロープが18S及び/または23S rRNA分子に知見されない生体のこの領域からプロープが増幅され得ることを示している。使用した方法は、他に記載しない限り、ROSSAUらのJ.Gen. Microbiol.; 135: 1735-1745, 1989または欧州特許出願第8940/045.3に記載の方法と本質的に同一である。rRNA遺伝子フラグメントの酵素増幅法及び逆ハイブリダイゼーションを除く他の方法は現在当業者に公知である。18S-23S rRNAスペーサー領域を広げるrRNA遺伝子フラグメントの酵素増幅法は、Perkin Elmer Cetusの"Gene Amp"キットに推薦される方法に従って実施したポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)により得られた。rRNA分子中に保存されたまたは半分保存された(semi-conserved)領域に対応するヌクレオチ

DをPCRプライマーとして使用した。逆ドット-プロット法の原理及びプロトコルは、Saikiら(1989)により記載されている。

実施例1

*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*の両方は、各々髄膜炎及び淋疾に関連する重要なヒト病原体である。これらの生体は非常に密接に関連しており、互い及び他の*Neisseria*種との差別化は間違ひ易い。*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*に特異的なDNAプロープは、両方の*Neisseria*種の間の正しい差別化を導く且つ臨床サンプル中でこれらの種を直接検出するために使用し得る。

*Neisseria gonorrhoeae*を検出するために多くのDNAプロープについて記載されてきた(欧州特許出願第0272 009号及び同第0337 896号; URDEAら, Clin.Chem.35:1571-1575, 1989; TOTTEAら, J.Infect.Dis.148: 462-471, 1989; DON EGANら, Mol.Cell.Probes 3: 13-26, 1989; KOLBERGら, Mol.Cell.Probes 3: 59-72, 1989)。しかしながら、これらのプロープの内の幾つかは、非-*Neisseria gonorrhoeae*株と交差するか、感度が高くないことが知見された。これ

らのプローブは総て16S-23S rRNAスペーサー領域由来ではなかった。

*Neisseria meningitidis*株を検出するDNAプローブも報告された(KOLBERGら, Mol.Cell. Probes 3: 59-72, 1989)。*Neisseria gonorrhoeae*のピリン遺伝子から誘導されたこのプローブも、*Neisseria meningitidis*に関して非常に特異性でもなく感度も高くはなかった。

*Neisseria gonorrhoeae*及び*Neisseria meningitidis*型株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列を、スペーサー領域を広げるPCRフラグメント由来のクローン化した物質を使用して決定した。図3に示されている両方の列から、幾つかの潜在的なプローブ配列が明らかになった。

約60塩基対の予想外の挿入配列を、*Neisseria meningitidis*株のスペーサー領域中に検出した。以下の配列：

```
GGTCAAGTGT GACCTCCCC TC NM11
GTTCTTGCTC AAGTGTGACC TC NM12
```

を有するオリゴヌクレオチドを、この挿入した配列から誘導した。

(図3の*Neisseria meningitidis*配列の塩基対365〜386

由来の)スペーサー領域のもう1つのエリアでも、*Neisseria meningitidis*と*Neisseria gonorrhoeae*との間ではかなりの度合いで食い違いが明らかになった。このエリアから、2種類のオリゴヌクレオチドプローブ(*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*の検出用のNM13及びNM11)：

```
CGGTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC NM13
CGATCCGTCG TTATTCTACT TCCG NM11
```

が化学的に合成された。

これらのヌクレオチドを、ポリヌクレオチドキナーゼを使用してその5'末端を³²Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してその3'末端でジゴキシグニン化したUTPと結合して、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、幾々の位置由来の多くの*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*株由来のドット-スポットした変性ゲノムDNA及び他の細菌(bacterial taxa)由来の幾つかの株を使用した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%,

w/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及びシアロをかけて変性したサケ精液DNA(0.1µg/µl)であるか、または5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)を使用し且つホルムアミドを20% (v/v)まで添加した以外には、非-放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸緩衝液pH7.1を含んでいた。

ハイブリダイゼーションの結果は、以下の表にまとめられている。各プローブ毎のハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、括弧内に示されている。試験した総てのプローブは、*Neisseria gonorrhoeae*(プローブNM11)または*Neisseria meningitidis*(プローブNM11, NM12及びNM13)に対し非常に特異性で且つ感度が高かったことが証明された。

分 類	陽性株数/試験株数			
	NM11 (45°C)	NM12 (45°C)	NM13 (40°C)	NG11 (50°C)
<i>Neisseria meningitidis</i>	32/33	10/11	36/36	0/11
<i>Neisseria</i> sp ATCC 43631	1/1	1/1	1/1	0/10
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0/16	0/9	0/10	10/10
<i>Neisseria polysacchara</i>	0/3	-	0/3	0/3
<i>Neisseria lactamica</i>	0/10	-	0/10	0/10
<i>Neisseria cinerea</i>	0/4	-	0/4	2/4
<i>Neisseria mucosa</i>	0/3	-	0/3	0/3
<i>Neisseria mucosae</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria flavescens</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria subflava</i>	0/2	-	0/2	0/2
<i>Neisseria sicca</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria elongata</i>	0/2	-	0/2	0/2
<i>Neisseria canis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria animalis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria denitrificans</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria</i> sp	0/3	-	0/4	0/3
CDC group M-3	0/1	-	0/1	0/1
CDC group EF-4a	0/1	-	0/1	0/1
<i>Kingella denitrificans</i>	0/2	-	0/1	0/1
<i>Kingella kingae</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella muelleri</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella crassa</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella steciae</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella</i> sp	0/1	-	0/1	0/1
<i>Abiella filiformis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Elkanella corrodens</i>	0/2	-	0/2	0/2
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Idrobacter fluidus</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Aquaspirillum dispar</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Comamonas testosteroni</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Haemophilus influenzae</i>	0/1	-	-	-
<i>Haemophilus ducreyi</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Kingella indologenes</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Moraxella lacunosa</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0/3	-	0/2	0/2
<i>Moraxella cuniculi</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella canis</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella ovis</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella palpealis</i>	0/1	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	0/1	0/1	0/1	0/1

NMI3及びNCI3で検出する特異性を、16S rRNA遺伝子の3'末端及び23S rRNA遺伝子の5'末端に各々配置している以下の増幅プライマー:

TGGCTCAAGTCCTAACAAGCTA AP18

CAC GTC CTTCCTGGCCT AP23

とのスぺーサー領域の酵素増幅後においてもチェックした。*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus ducreyi*, *Bordetella pertussis*及び*Branhamella catarrhalis*の株由来のゲノムDNAの100ナノグラムをPCR反応に使用した。増幅後、収量の1/10をアガロースゲルに装填し、電気泳動させ、ナイロン膜上にプロットした。

就いてこの膜をプローブNCI1及びNMI3でハイブリダイズした。

各々NCI1またはNMI3をプローブとして使用したとき、*Neisseria gonorrhoeae*または*Neisseria meningitidis*物質が存在するレーンだけにはっきりしたハイブリダイゼーションシグナルが検出できた。

実施例2

*Bordetella pertussis*は、百日咳の原因となる因子であ

*Bordetella pertussis*の検出用プローブは、文献(PARKら, FEMS Microbiol. Lett. 52:19-24, 1988; McPHEAT及びMcNALLY, J. Gen. Microbiol. 133:323-330, 1987及びFEMS Microbiol. Lett. 41:357-360, 1987; McLAFFERTYら, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology C-168, 1986及びC-322, 1987)に記載されている。McLAFFERTYら(1986及び1987)に記載のプローブは、特異性が高くない。記載の他のプローブに関しては、示されたデータは特異性及び感度の度合いを推論するには不十分である。

以下の株のリボソームRNA遺伝子の一部を酵素的に増幅し、プラスミドベクター:*Bordetella pertussis* ATCC 10380, *Bordetella parapertussis* NCTC 5952(型株)及び*Bordetella bronchiseptica* NCTC 452(型株)にクローン化した。種々の種類のクローン化したフラグメントを、ジデオキシヌクレオチド法を使用して一部配列し、その配列を比較した。16S rRNA遺伝子に拘わる配列情報は、種-特異性プローブが与えられないことを示している(ROSSAUら, 未発表)。しかしながら図2のアライメントに示されたように、相同でないエリア(271塩基対〜約300)が*Bordetella pertussis*

る。再度の予防接種キャンペーンにより、この病気は先進国では殆ど問題ではない。しかしながら第3世界の国々においては、*Bordetella pertussis*は、幼児の致死率のトップである。

3種類の*Bordetella*種(*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*)の株は、非常に関連しているので(KLOSら, Int. J. Syst. Bacteriol. 31:173-176, 1981; DE LEYら, Int. J. Syst. Bacteriol. 38:405-414, 1988)、ひとつの遺伝子種に属するものとして考えるべきである。この遺伝子型の関係は、これらの細菌の他の多くの特徴にも反映するので、その表現型の差別化が冗長となる。

百日咳の臨床兆候はたいてい非定型であり、検査室診断が必要である。感度が高く、特異的で迅速な試験はまだ無い。増殖には選択方法が残っているが、回収率は低く且つ結果は通常、接種後3〜7日しか有効でない(FRIEDMAN, Clin. Microbiol. Rev. 4:365-376, 1988; HALPERINら, J. Clin. Microbiol. 27:752-757, 1989)。DNAプローブベースの分析は、*Bordetella pertussis*感染の診断を非常に改良し得る。

及び*Bordetella bronchiseptica*株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスぺーサー領域に知見された。

*Bordetella parapertussis*株のスぺーサー領域の配列は、*Bordetella bronchiseptica*配列と大体同一である(ROSSAUら, 未発表)。

*Bordetella pertussis*のスぺーサー領域のヌクレオチド271と295との間のエリアから、以下の配列:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GCCTT BPI1

を有するオリゴヌクレオチドプローブを調製した。

オリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、ターミナルトランスフェラーゼを使用してジデオキシジチミン-UTPでラベルした。ターゲットとしてドット-スポットし、変性したゲノムDNAで得られた結果を以下の表にまとめた。

分 類 55℃におけるBP11とのハイブリダイゼーション
陽性株数/試験株数

<i>Bordetella pertussis</i>	4/4
<i>Bordetella parapertussis</i>	0/3
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0/3
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	0/1
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	0/1
<i>Uligella ureolytica</i>	0/1
<i>Uligella urethralis</i>	0/1
<i>Taylorella equigenitalis</i>	0/1
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0/1
<i>Pseudomonas solanaceorum</i>	0/1
<i>Comamonas testosteroni</i>	0/1
<i>Neisseria meningitidis</i>	0/1
<i>Branhamella catarrhalis</i>	0/1
<i>Haemophilus influenzae</i>	0/1

使用条件下に於いて、アプローブBP11は*Bordetella pertussis*に対し100%特異性で且つ100%の感度であることを証明した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC:0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したことを除いて、非-放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートに記載のものと同一であった。洗浄液は3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は55℃であった。

られた。

表 例 3

*Moraxella catarrhalis*または*Neisseria catarrhalis*とも知られる*Branhamella catarrhalis*は、特殊培養基を必要とする生化学的に不活性な細菌である。近年、その重要な病原体としての潜在能力が認識された。

*Branhamella catarrhalis*は、重い気道感染症によく含まれる(RACERら, Rev. Infect. Dis. 9:1140-1149, 1987)。*Branhamella catarrhalis*の診断には、特殊培養基を必要としない微生物による異常増殖により阻止されるこの生体の増地と、この生体と口腔内に存在する共働生物(例えば、*Neisseria*種など)とを区別するための一組の表現型試験器具が必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来の*Branhamella catarrhalis*を差別化する試験は限られているので、表現型試験は、検定上の*Branhamella catarrhalis*単離物の鑑別に関しては決定的ではない(RIOU及びGUIBOURDENCHE, Drugs 31[補遺.3]:1-8, 1986)。分析に基づいたDNAプローブを使用すると、*Branhamella catarrhalis*の検査を診断をかなり簡素化できる。未特定DNAフラグメントから誘導し、*Neisser*

逆ドット-プロット分析を利用すると、上記表に示されているのと同質的に同一結果が得られた。この分析は以下のように実施した：

異なる細菌種から得られた種々の株からの細菌DNA100を、ジオキシゲニン-11-dUTP(Boehringer Mannheim)を増幅混合物に添加して最終濃度40μMとした以外には、Gene-Ampキット(Perkin Elmer Cetus)の製造業者により推奨されるように酵素的に増幅した。プライマーAP16及びAP23(表 例 1 参照)を用いて全部で50pLで30サイクル(1分/95℃, 1分/50℃, 1分/72℃)実施し、その後各PCR混合物の5μLを膜の存在下にハイブリダイゼーション混合物(上記定義通りの組成物)1μLに添加し、これにアプローブBP11の0.2pmol、0.02pmol及び0.002pmolを固定した。ハイブリダイゼーションを55℃で1時間実施した。洗浄工程を同一温度で10分間実施した。非-放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)に記載の如く検出した。ゲル電気泳動及び逆ドット-プロットプロトコルを使用する異化エチジウム染色後に実施した全サンプル中にはっきりしたバンドを検出したが、もっぱら*Bordetella pertussis* DNAが存在するサンプルにはっきりした陽性シグナルが得

*ia caviae*由来のDNAで交差ハイブリダイズした*Branhamella catarrhalis*用のDNAアプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている(Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No.D-249, 1989)。

Branhamella catarrhalis ITC 4197のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ連鎖反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローン化した。続いて18S-23S rRNAスベーター領域を広げるフラグメントをジデオキシリン酸停止法により配列した。この配列は図7に示されている(上列)。配列データより、以下のオリゴヌクレオチド：

TATCACAAGC AAGCTTCCTA ACTTCCTT BCI 1

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末端でポリヌクレオチドキナーゼで³²Pラベルし、ハイブリダイゼーションアプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の31*Branhamella catarrhalis*株及び他の細菌分類の19株のドット-スポットした、変性ゲノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)、25mM

リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20% v/v)、Ficoll(0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及びシアをかけた変性したサケ精液DNA(0.1mg ml⁻¹)であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸塩緩衝液pH 7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、30℃であった。

使用条件下で、プローブBC11を載ての*Branhamella catarrhalis*株にハイブリダイズした。他の細菌種に属する試験した株は載て、このプローブに対し強いハイブリダイゼーションシグナルを与えた。

試験した非-*Branhamella catarrhalis*株は:

<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967
<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17952
<i>Moraxella bovis</i>	ITM 1601
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	ATCC 19975
<i>Neisseria gonococci</i>	ITM 3388
<i>Neisseria ovis</i>	NCTC 11227
<i>Neisseria ovis</i>	ATCC 14859
<i>Allysiella sp.</i>	ATCC 29468
<i>Moraxella osloensis</i>	LMC 1043
<i>Moraxella osloensis</i>	ATCC 17974
" <i>Moraxella paraphenylypruvica</i> "	LMC 5125
" <i>Moraxella carcerbertii</i> "	LMC 7022
<i>Psychrobacter immobilis</i>	LMC 6784
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23005
<i>Escherichia coli</i>	B
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8143

CACCCCTTTAA TCCGAAGATA TTACC HD11

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で³²Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジギキシン化UTPとその3'末端を結合し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

ターゲットとして、種々の位置からの41 *Haemophilus ducreyi*株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ドット-スポットした変性したゲノムDNAを使用した。載ての*Haemophilus ducreyi*株にもつらハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したことを除いて、3×SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及びシアをかけた変性したサケ精液DNA(0.1mg ml⁻¹)または、非-放射能DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートの溶液であつ

Eikenella corrodens
Xanthomonas maltophilia
Xanthomonas campestris

NCTC 10596
LMC 958
LMC 588

であった。

実施例4

軟性下疳の原因となる*Haemophilus ducreyi*は、培養増殖を必要とするグラム陰性細菌である。この生体の増殖は困難で且つ感度が無いが、依然として、*Haemophilus ducreyi*感染の診断のための選択方法である。特異性の高いプローブを使用すると、増殖が不要で且つ診断の感度が強くなる。他の*Haemophilus*及び*Pasturella*種と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をターゲットとする*Haemophilus ducreyi*用のクローン化したDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている(J.Clin.Microbiol. 27:1441-1445,1989)。

Haemophilus ducreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一部をポリメラーゼ鎖反応により断片的に増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。

18Sと23S rRNA遺伝子との間のスパーサー領域の配列は、ジデオキシ順序停止法により得られた。核酸配列より、以下のオリゴヌクレオチド:

た。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、40℃であった。

試験した非-*Haemophilus ducreyi*株は:

<i>Escherichia coli</i> MC 1061
<i>Escherichia coli</i> B
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> NCTC 9710
<i>Actinobacillus lignieresii</i> NCTC 4189
<i>Haemophilus aphrophilus</i> NCTC 5908
<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8143
<i>Haemophilus ovis</i> HIM 896-7
<i>Pasteurella multocida</i> NCTC 10822
<i>Branhamella catarrhalis</i> ITM 4187
<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 17407
<i>Qliella urethralis</i> LMC 6227
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ITM 4437
<i>Campylobacter jejuni</i> CCUG 11284
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055
未識別株 ITM 3585

であった。

実施例5

グラム陰性細菌種*Haemophilus influenzae*は、2種類のバイオグループ: *influenzae*及び*egyptius*に分類することが出来る(Casimir, Ann.Inst.Pasteur/Microbiol. 137B:155-163, 1988)。 *influenzae*バイオグループの生体は、重要な呼吸器道の病原体であり、子供の肺炎及び耳炎の原因でもある。バイオグループ*egyptius*単離物は、悪い

気候では、細菌性結膜炎の原因として作用する因子であり、ブラジル紫斑熱と関連しているらしい(Brennerら, J.Clin. Microbiol. 28: 1524-1534, 1988)。分類可能な及び非-分類可能な *Haemophilus influenzae* は、核酸プローブにより迅速に検出され得る。

この種のDNAプローブは、文献に記載されている(Terpstraら, Scand.J.Infect.Dis.19:841-846,1987; Høibyら, J.Clin.Microbiol.28: 2132-2138, 1988)。これらのプローブは18S-23S rRNAスペーサー領域から誘導されているものではない。

Haemophilus influenzae NCTC 8143型株のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ鎖反応により断片的に増幅させ、次いでプラスミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列がジデオキシ鎖停止方法により得られた。核酸配列から、以下のオリゴヌクレオチド:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT H111
ACTTTCAAGT GAAAACCTAA AG H112

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で³²Pラベルし、ハイ

ブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、細菌の分類単位のドット-スポットした、変性したゲノムDNAを使用した。

両方のプローブを使用したハイブリダイゼーション結果を以下の表にまとめた。使用したハイブリダイゼーション及び洗浄温度では、プローブH111は*Haemophilus influenzae* バイオグループ *paraphilus* 株にハイブリダイズしなかった。プローブH112は、両方のバイオグループの株にハイブリダイズした。両方のプローブは、表示温度で, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiumから得た他の15種類の*Haemophilus influenzae* バイオグループ *influenzae* の臨床分離物にもハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーション混合物は、3×SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及びシアエを掛けて変性したサク糖液DNA(0.1μg xL⁻¹)であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸緩衝液pH 7.1を含んでいた。

分類単位	プローブ	
	H111(50°C)	H112(30°C)
<i>Haemophilus influenzae</i> (A119-7 <i>influenzae</i>) NCTC 8143	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i> (A119-7 <i>influenzae</i>) ITN 3837	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i> (A119-7 <i>paraphilus</i>) ITN 859	-	+
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> ITN 402	-	-
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ITN 1094	-	-
<i>Haemophilus aphrophilus</i> NCTC 5906	-	-
<i>Haemophilus ducreyi</i> CIP 542	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> NCTC 10322	-	-
<i>Pasteurella piscicida</i> ATCC 17911	-	-
<i>Actinobacillus ljungensis</i> NCTC 4189	-	-
<i>Actinobacillus actinovesiculocornutus</i> NCTC 9710	-	-
<i>Blastophilus ovis</i> HIM 896-7	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 25609	-	-
<i>Actinobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055	-	-
<i>Branhamella catarrhalis</i> LNC 5128	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> NCTC 8189	-	-
<i>Escherichia coli</i> B	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> NCTC 10025	-	-

Fig. 1

```

AGAGAAAGAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50
AGAGAAAGAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50
TGCAGGAAGAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTTCGCTTAAGAAGGAAACCGG -100
TGCAGGAAGAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTTCGCTTAAGAAGGAAACCGG -100
GTTTGTAGCTCAGCTGCTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGCTCGGA -150
GTTTGTAGCTCAGCTGCTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGCTCGGA -150
GGTTCAGTCTCTCCAGACCCACCAAGAAAGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -200
GGTTCAGTCTCTCCAGACCCACCAAGAAAGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -200
AGAGCACTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCGTTTGCCT -250
AGAGCACTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCGTTTGCCT -250
CCACCAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTTCGTTTATTAGAGCTTAT -300
CCACCAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTTCGTTTATTAGAGCTTAT -300
TTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC
TTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC

```

Fig. 2

AAGAGCTTGGAGTCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTGTGTAT -50
 AAGAGCTTGGAGTCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTGTGTAT -50
 ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGTTTCGGGG -100
 ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGTTTCGGGG -100
 TCTGTAGCTCAGTCCGTTAGAGCACCCTCTTGAATAAGCGGGGGTCTTG -150
 TCTGTAGCTCAGTCCGTTAGAGCACCCTCTTGAATAAGCGGGGGTCTTG -150
 GTTGAATCCAACAGACCCACCAAGGTTTCTGAGAGCGAAATGGGGT -200
 GTTGAATCCAACAGACCCACCAAGGTTTCTGAGAGCGAAATGGGGT -200
 GTAGCTCAGTCCGAGAGCGCTGCTTTCGAAGCAGGATGTCATCGGTT -250
 GTAGCTCAGTCCGAGAGCGCTGCTTTCGAAGCAGGATGTCATCGGTT -250
 GATCCCGTTACCTCCACCAAGGCTGCTGAGAGGATGGGTGTGHHNG -299
 GATCCCGTTACCTCCACCAAGGCTGCTGAGAGGATGGGTGTGHHNG -299
 -----AGACCAG--AAGCGGAGAGAGCAACGTTAGTGTGCGAGTCAGTG -342
 CAGGCGAGACCCAGAGCGGAGAGAGCAACGTTAGTGTGCGAGTCAGTG -350
 TTAAGCGTTGGGTTTGGCGGACAGCTATATATGTTCTTAAACAATTGG -392
 TTAAGCGTTGGGTTTGGCGGACAGCTATATATGTTCTTAAACAATTGG -400
 AAGAAGCAACAGTAAAGTCTGCTTATAGTGTGCGGAGTGTGATGAA -442
 AAGAAGCAACAGTAAAGTCTGCTTATAGTGTGCGGAGTGTGATGAA -450
 CAGCGATACGGGTTGTGATGTCATGATTTGTTCCAAAGTCTCAAGAACTG -492
 CAGCGATACGGGTTGTGATGTCATGATTTGTTCCAAAGTCTCAAGAACTG -500
 GCTGGCGGCGCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACCTATGAAGGACACA -542
 GCTGGCGGCGCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACCTATGAAGGACACA -550
 AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTATAG -582
 AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTATAG -590

Fig. 4

A-CAGAAAGAGGGGCTTT--AGGCATTACACTTATCGGTAACTGAAA -47
 AAGAGCTTGGAGTCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGT--TGTG -46
 AGATCCGGAAGAGCTTCAGTGAAGGCAAGGTTTCTTGAAGAGGAAAC -97
 TTATATAGTCTGCTGAGTGGTGGCTGCT--GATCCGAGAGAGAAAGGTTT -95
 -CGGCTTGTAGCTCAGTGTGTTAGAGCACCCTGTTGATAAGCTGAGGT -146
 CGCGGTCTGTAGCTCAGTGTGTTAGAGCACCCTGTTGATAAGCGGGGT -145
 CGAGGTTCAAGTCTCCAGACCCACCAAG-----AACG -181
 CGTTGCTGGAATCCACAGACCCACCAAGGTTTCTGAGAGGAAATG -195
 GGGGCTAGCTCAGTGTGATGAGCACCCTGCTTTGCAAGCAGGGGTCACT -231
 GGGGTGTAGCTCAGTGTGAGAGCGGCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATC -245
 GOTTGATCCGTTTGTGCTGCAACAAACTTTACAAATGAAGCAAGTTT -281
 GOTTGATCCGTTTGTGCTGCAACAAAGCTTTCAGAGGATGGGTGTG -295
 GCTGTTTATGACAGCTATTTTGTGTTGGAAGTGAATAACGAGCATC -331
 XNNGAGACCAAGAGCGGAGA--GA--GCAACGTT--AGTGTGCGAGTC -338
 GATCTTAAACAAATTTGGAAGCGGAAATCAACAAACAAAGACATGAGTT -381
 AGTGTAAAGC--TTGG--GTTTGGCGGACAGCTATATA--T--GTT -378
 TGTTTTGAATTTTATCTTTCGAAAGGATAAAAATC--TCTGCAAGAG -430
 CTTTAAACATTTGGAAGAGCAACAGTA--AGTGTGCTTTAGTGTG -427
 AAGAGAAACAAACATA--GTATTTGGGTGATGTTGATCAGCTTAATCC -479
 GCGCGATCGATGAAGACGGATACGGGTTGTGATTCAT--GATTTGTTTC -476
 TGAACACAAAGGAGGATTAAGACACAAAGCAGTAACTTTATCA -529
 CAACTCTCAAGAA--CTGCTCG--G--CGGCAAGC--GT--TTGTCTCA -516
 AAGTACGATTTCAAGTTGCTTACTTACTGTC--CGGTAAGTAAGCA -578
 GA--T--GCTTGAAGCTTA--TCAACGGCAGACCGGAGTCAACAGC -560
 GTCAAGAGATCTTGAATGATAG -603
 CTATAAGACTTATG--TTATAG -582

Fig. 3

AGAGAAGAGAGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAACTGAAAAG -50
 AGAGAAGAGAGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAACTGAAAAG -49
 ATGCGGAAGAGCTTGAAGTGAAGGCAAGATTCGTTAAGAGAGAAATCGG -100
 ATGCGGAAGAGCTTGAAGTGAAGGCAAGATTCGTTAAGAGAGAAATCGG -99
 GGTGTAGCTCAGTGTGTAGAGCACCCTGATTAAGCTGCGGTGCGG -150
 GGTGTAGCTCAGTGTGTAGAGCACCCTGATTAAGCTGCGGTGCGG -149
 AGGTTCAAGTCTCCAGACCCACCAAGAGCGGGGGCATAGCTGATTC -200
 AGGTTCAAGTCTCCAGACCCACCAAGAGCGGGGG--CATAGCTGATTC -198
 GTAGAGACCTGCTTTCAGACCGGGGTCTCGGTTCGATCCGCTTTCG -250
 GTAGAGACCTGCTTTCAGACCGGGGTCTCGGTTCGATCCGCTTTCG -248
 CTCACCAATFACTGTAAATCAAAAGCGAAGATGAACAGATTCAT -280
 CTCACCAATFACTGTAAATCAAAAGCGAAGATGAACAGATTCAT -280
 -----TTCGTTTTTATAG--CAG -293
 CAGGGCGAGCTCAGCTTACCAAGAGCAAAATGCTGATATAATACAG -350
 -----TTCGTTTTTATAG--CAG -293
 CTCGTTTGAATTTGACAGATAGATAGCAATATCGAACCGATCGCTTGA -400
 CTTATTTGATTTGCAAGTAGA-----ATACGA--CGATCGATCTTGA -339
 ACAAATTCGAAGCGGAAATCAACAAAGAGAGCAAGCGTTTGTGGA -450
 ACAAATTCGAAGCGGAAATCAACAAAGAGAGCAAGCGTTTGTGGA -389
 TTTTATTTCTTTCGAAGGATAAAATATCGCTCAGAGAGAGAGAGAA -500
 TTTTATTTCTTTCGAAGGATAAAATATCGCTCAGAGAGAGAGAGAA -439
 CAACACAGTATTTGGGTGATGATTTGATGACTTAACCTTGAAACAA -550
 CAACACAGTATTTGGGTGATGATTTGATGACTTAACCTTGAAACAA -489
 AAGCGAGATTAAGACACAAAGCAATAGCTTTATCAAGTGAAGAA -600
 AAGCGAGATTAAGACACAAAGCAATAGCTTTATCAAGTGAAGAA -539
 TTCAGCTCAGTCTCAGTCAAGCGGATTTGAGGCAAGTCAAGAGT -650
 TTCAGCTCAGTCTCAGTCAAGCGGATTTGAGGCAAGTCAAGAGT -589
 TCTTGAATGATAG -664
 TCTTGAATGATAG -603

Fig. 5

AC-----GAG--TT-----AT-----CTGATTGCA--GAA----- -24
 AGAGAAGAGAGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAACTGAAAAG -50
 TCCACCAAG--TGTCTTTGTTGAAGT--GTTTAA-----AAAC--GG -64
 TCGGAAGAGCTTGAAGTGAAGGCAAGGTTTCTGTTAAGAGAGAAACCGG -100
 GCTATAGCTCAGTGTGTAGAGCACCCTGCTGATTAAGCGGCG--GCTAT -113
 GTTGTAGCTCAGTGTGTAGAGCACCCTGCTGATTAAGCGGCG--GCTAT -149
 AAGTCAAGTCTTATAGACCCACCATTTT--GGGGCCATAGCTAGTTGG -162
 AGTTCAGTCTTCCAGACCCACCAAGAGCGGGGCTAGCTAGTTGG -199
 TAGAGCGCTGCTTTCAGCGAGGAGGTCAGGAGTTCGACTTCTTTCG -212
 TAGAGCGCTGCTTTCAGCGAGGAGGTCAGGAGTTCGACTTCTTTCG -249
 TCCACCAAGCAAGTTAAACATCAAGACATAGCAATTAATAAG -262
 TCCACCA--AACTTTACAAATGAAGCAAG--TTTGTGTTTATAGAG -295
 ATTCTTATTTATGCTTT--TATTTTATAAAGTGA--CGAAGTTATAACAT -310
 CTTATTTGATTTTGGAAATGAAATTAACGAGCATGATCTTAACAAAT -345
 T-----ATTTAACAA--CATAGT--ATGAGTCTCGGTAAATATT -347
 TGGAAAGCGAATCAACAAAGAGCAATGAGTTTGTTTGATTTT -395
 AAT--TCCACCAATTAATAACCTGCTGTTTGT--ACCCATCAACAA -392
 ATTCTTGAAGAGTAAAAATCTCTGCAAGAGAGAAAGAAACAAAC -443
 CCAAA-----AAAGTAAAG--AA--CTGAATCA--G-- -421
 TAGTATTTGGGTGATGATTTGATGACTTAATCTGAAACAAAGAGCA -495
 GTA-----AACATAGTG--AATCGTTA--CACATTACCAATA--CAC -458
 GGATTAAGACACAAAGCAGTAAAGCTTTATCAAGTGAAGGATTTCAAG -545
 -----AC-----CAAGACTTCTA--GAGTCAAGCT--CTTGG -490
 TTTGCTTACTTATGCAACGGGTAGGTAAACGAGTCAAGAGTCTTGA -595
 GCTTGTAT -498
 AATGATAG -603

Fig. 6

C----- -1
CTTAACCTTCGGAGGGCGCTTACCACTTCTGATTGATGACTGGGGTGA -50
-----CAAAATAA-----AG-----AC-----ATCAC----- -18
AGTCGTAAACAAGGTAAACCGTAGGGGAACCTCGCGGTTCGATCACCCTCTTA -100
-----AAGTA-----CTCACACAGATTGTTGATTCTTTT -48
CCTTAAAGAACGCTACTTTGTAGTCTCACACAGATTGCTGATAGAAAG -150
AGA-----CAAGTCG-----GAATA----- -63
TGAAUAGCAAGCGCTTACGCGTTGGGAGTGAGGCTGAAGAGAATAAGGC -200
CAT-----CTTT-----AAATGT----- -76
CGTTCGCTTTCTATTAAATGAAGCTCACCCCTACACGAAATATCACGCAA -250
-----TGTCCCATCTCTCTAGAGGCCCTAGGCAT -106
CGCGTGATAAGCAATTTTCGTGTCCTTC-GTCTAGAGGCCAGGACAC -299
CGCCCTTTACCGCGGTAAACGGGGTTCGAAGCCCG--GTGACGCCATC -154
CGCCCTTTACCGCGGTAAACGGGGTTCGAATCCCTACGGGACGCEA-C -348
TAAAGATGATTTT-ATTGCTTATGTT--CTTTAAAAAATAGAAACAA -201
TT--GCTGGTTGTGAGTGAAAGTCCCGACCTTAATATCTCAAAACTCA -396
GCT---GAAACTGAGAGATTTCTAAAGTAGAAAGTCTGAGT-AACTCT -246
TCTTCGGGTGATCTTGTGAGATTTTCTCTTTAAAAATCTGGATCAAGCT -446
AAATCTTAG--CTGAACAAAGCAGCTAAGTGTGTAGTCTAAATCAAT -293
GAAATCTGAACACTGAACACGAGAGTGTGCTG-AGTCTCTCAAAAT -495
AACCACAGTATATCAATATGCTCGCGCATATAAAATCTTGAAGTTC -343
TTCC-CAACAGAT--GATGAATCGA--AAGAAATCTTCGGGTTC -537
TAT -346
TGA -540

Fig. 8

CTGAAGACGAGAGACAGCGAGTGTCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50
CCCAAGACGAGAGACAGCGAGTGTCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50
ACAAGATTAATAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAA -100
ACAAGATTAATAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAA -100
ATAAAAGAAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCATCGCTAGAGGC -150
ATAAAAGAAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCATCGCTAGAGGC -150
CTAGGACATCGCCCTTTACCGCGGTAAACGGGGTTCGAATCCCGGTGGG -200
CTAGGACATCGCCCTTTACCGCGGTAAACGGGGTTCGAATCCCGGTGGG -200
ACGCCAATTAAGATAACTTTATTAGATTGTCTTACTGTTCTTTAAATTT -250
ACGCCANNNNNNNNNNNNNTTTATTAGATTGTCTTACTGTTCTTTAAAAAA -250
TTGGAACAAAGCTGAAACCAAGAGATTTTCGAGAGAAAGTCTGAGTAGGC -300
TTGGAACAAAGCTGAAACCAAGAGATTTTCGAGAGAAAGTCTGAGTAGGC -300
AAGATAGGAAAGTGAAGAGGAGGAACTGAAAGGGAACCTCTAAAAACAAA -350
AAGACAGGAAAGTGAAGAGGGAACCTGAGAGGAAACCTCTAAAAACAAA -350
ACCTGTTTTCGATAAAA-TCTTGATTGAACAAAAGCAATCAAGTCTTTAG -399
-CCTGTTTGTAAAAAATCTTGATTGAACAAAAGTAATCAAGTCTTTAG -399
TTGAATGAAATACGCATCAAAATGACCGCACTTTGAAGTGAAGAACTTAA -449
TTGAATGAA--TGAGGCTGAAAGTGCAGTCAAAAGTACGGTATCTATTTTA -447
-AGTGA---TTGAAACATTTGAGGTGAT -474
TATTGAGTTTGAAGCAATTTGANNNNNN -476

Fig. 7

ACGAAGTTATCTGATTGGCAAGATCCACAACAGTTGTTCTTTGGTAAAG -50
ACGAGATTATCTGATTGGCAAGATCCACAACAGTTGTTCTTTAG-TAGT -49
ATGTTTAAAAACGGCTCTATAGCTCAGTTCGTTAGAGCACCGGTGTGATA -100
GTAAGTTAAATTGGCTCTATAGCTCAGTTCGTTAGAGCACCGCTCTGATA -99
ACCGCGGGGTCAATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGCCA -150
AGCGCGGGGTCAATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGTTA -149
TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTCGCTTCACGAGGAGGTCAAGGAGTTCG -200
TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTCGCTTCACGAGGAGGTCAAGGAGTTCG -199
ACTCTCTTGGCTCCACCAAGCAAGTTTAA--ACATCAAGCATACATAA -248
ACTCTCTTAACTCCACCACTTCAATAAATCAGAACTAAGCAATCAAAAT -249
GCAAT---TTAAATAAGATTTCTTATTATGCTTT--TATTTTA--TA -289
TAGATAACATAAAATTAGATTTTCTTACTTCTACTTTATGTAGATGACTTA -299
---AAGTACGAGGTTTATAACA-TTATTTAACACATAG-TATGAGT -332
CAATTAAGTATGAGTTAAATTTCAATATTATTAACACATATATATGAGT -349
CTGGTTAAATTTAATTCAACAAATAAATTAACCTGGTGTGTATC-C -381
CTGGTTAAATTTAATTCAACAAATAAATTAACCTGGTGTGTATC -399
CA-----ATACAAACACCAAA-----A -398
CACATCAAGCATATAAAGTTAAACTTTTAGTATTGATGATGATCGGATA -449
AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACAT -448
AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACAT -499
ACCCATACACACCAAGAGCTTCCTAGAAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT -498
ACCCATACACACCAAGAGCTTCCTAGAAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT -549


Fig. 9

AAGGATAAGGAA--CTGCCCATG-GTCTTGTGTAGTCTTGAAGGTTCTT -47
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTCGCTCTGTTTGTAGTTTGAAGGTTCTT -50
CTGGGGCTTACCTCAGCTGGGAGAGCGCTGCTTTGCACGAGGAGGTC -97
CTGGGGCTTACCTCAGCTGGGAGAGCGCTGCTTTGCACGAGGAGGTC -100
AGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGCTGAGAGATCAACCAAGTAATGC -147
AGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAAT--TGT -148
ACATTGAAATTTGAATATCTATATCAAAAT----- -176
TCATTGAAATTTGAATATCTATATCAAAATTCACGATCTAGAAATAGATT -198
-----AGTAAACAGAAAATAAACCGAAACCGCTGT-AGTATT-AATAAG -218
GTAGAAAGTAAACAGAAAATAAACCGAAACCGCTGTGAATATTTAATGAG -248
AGTTTATGACTGAAAGG---TCAGAAAATAA -246
TTTTCTAGTTTAAAGAACTAGGTTAATAA -279

補正書の写し（翻訳文）提出書（特許法第 113 条の 4）

平成4年10月19日 通

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 特許出願の表示 PCT/EP 91/00743
2. 発明の名称 16S及び23S rRNA遺伝子間のスぺーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプローブ
3. 特許出願人
住 所 ベルギー国、ペー-9710・ヘント、ボックス・4、
インドウストリーパルク・ズベイナーデル・?
名 称 エヌ・ペー・イノヘネティクス・エス・アー
4. 代 理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 3354-8623
(6200) 弁理士 川 口 義 雄

(ほか3名)
5. 補正書の提出年月日 1992年2月5日
6. 添附書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1. **1.1**

要約

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定の
には細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも
約15ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチドへ
スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好まし
くは約15〜約100ヌクレオチドから構成される非ウイ
ルス微生物検出用プローブに係る。

Branhamella catarrhalisは、重い気道感染症によく含まれる (BAGERら, Rev. Infect. Dis. 9:1140-1149, 1987)。Branhamella catarrhalisの診断には、特殊培養基を必要としない微生物による異常増殖により阻止されるこの生体の増殖と、この生体と口腔内に存在する共助生物 (例えば、*Neisseria* 種など) とを区別するための一組の表現型試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来の Branhamella catarrhalis は差別化を試験が限られているので、表現型試験は、推定上の Branhamella catarrhalis 単離物の識別に関しては決定的ではない (RIGU及び GUIBOURDENCHE, *Drugs* 31[補遺.3]: 1-6, 1988)。分析に基づいたDNAプローブを使用すると、Branhamella catarrhalis の検査室診断をかなり簡便化できる。未特定DNAフラグメントから誘導し、Neisseria caviae 由来のDNAで交差ハイブリダイズした Branhamella catarrhalis 用のDNAプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている (Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No.D-249, 1989)。

Brachanella catarrhalis ITG 4197のrRNA遺伝子の一部

を、ポリメラーゼ鎖反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローン化した。続いて16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキシ鎖停止法により配列した。この配列は図7に示されている(上列)。

配列データより、以下のオリゴヌクレオチド:

TTAAACATCT TACCAAAAC BCI 1

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末端でポリヌクレオチドキナーゼで³²Pラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の31 *Branhamella catarrhalis*株及び他の細菌分類の19株のドット-スポットした、変性ゲノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0), 25mM リン酸カリウム緩衝液, pH7, 脱イオン化ホルムアミド(20% v/v), Ficoll(0.02%, w/v), ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v), ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及びシアを掛けて変性したサケ精液DNA(0.1µg µl⁻¹)であった。

ターゲットとして、種々の位置からの41 *Haemophilus ducreyi*株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ドット-スポットした変性したゲノムDNAを使用した。総ての *Haemophilus ducreyi*株にもつばらハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したことを除いて、3×SSC, 25mM リン酸カリウム緩衝液, pH7, 脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v), Ficoll(0.02%, w/v), ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v), ポリビニルピロリドン(0.02%, w/v)及びシアを掛けて変性したサケ精液DNA(0.1µg µl⁻¹)または、非-放射能DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートで溶液であった。

特表平5-504889 (45)

この生体の増殖は、困難で且つ感度が無いが、依然として、*Haemophilus ducreyi*感染の診断のための選択方法である。特異性の高いプローブを使用すると、増殖が不要で且つ診断の感度が強くなる。他の *Haemophilus* 及び *Pasteurella* 種と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をターゲットとする *Haemophilus ducreyi* 用のクローン化したDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている(J. Clin. Microbiol. 27:1441-1445, 1989)。

Haemophilus ducreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一部をポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列は、ジデオキシ鎖停止法により得られた。核酸配列より、以下のオリゴヌクレオチド:

TTATTATCCG CCAGCCATAT TG BDI 1

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で³²Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジデオキシ化UTPでその3'末端を結合し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の1)

平成4年10月19日



特許庁長官 麻 生 誠 殿

1. 特許出願の表示 PCT/EP 91/00743
2. 発明の名称 16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプローブ
3. 特許出願人
住 所 ベルギー国、ペー-リ-ヘント、ボックス・1、
インドゥストリーバルク・ズベイナーデ・1
名 称 エヌ・ペー・イノヘネティクス・エス・アー
4. 代 理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号160) 電話(03) 3354-8821
(FAX) 弁理士 川 口 義 雄

(印 3名)

5. 補正書の提出年月日 1992年2月25日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文



1通

請求の範囲

1. 原核生物、より特定のには細菌の16S及び23SrRNA遺伝子間の転写スベーター領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチド〜スベーター領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成されるアプローブ。

2. 検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定のには細菌に固有であるように選択されたrRNA遺伝子間のスベーター領域、特に16SrRNA遺伝子及び23SrRNA遺伝子間のスベーター領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用アプローブであって、rRNA遺伝子間のスベーター領域の前記配列が、

・* 目的生物のrRNA遺伝子間のスベーター領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のrRNA遺伝子間のスベーター領域のヌクレオチド配列と比較し、

・* 最近隣種のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスベーター領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスベーター領域の少な

くとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又は

・* 短縮スベーター領域を得るように、目的生物のrRNA遺伝子間のスベーター領域からtRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ、

・* 少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜スベーター領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより、

選択されることを特徴とする請求項1に記載のアプローブ。

3. 一核糖グループ:

グループNC11:

CGATCCGTCG TTATTCYACT TCGC	NC11
CCCAACTAGA ATAACGACCG ATCG	NC11IC
CCGAACUAGA AUAACGACCG AUCC	NC11ICR
CGAUGCCGUC UUAUUCUACU UCCG	NC11R

グループNC12:

TCCGTTCCAT ATTGCTATCT ACTCTCCA	NH14
TCCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACCCA	NH14IC
UCCACAGUAG AUAGCAAUU CGAACCCA	NH14ICR
UCCGUUCCAU AUUGCUAUU ACUGUGCA	NH14R

グループNH15:

TTTGTCTTGTGGTCAACTGTGACGTCGCCCTCAATGCAATTCTCTCCATT	NH15
--	------

AATCGAACAGAAATCCATTACGGGGGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA	NH15IC
---	--------

AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGCCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA	NH15ICR
--	---------

UUUUGUUCUUGGCUAAGUGUGACGCGGCCUGAAUGCAUUCGUGUCCAUU	NH15R
---	-------

グループNH16:

TTTCCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAATATC AGAC	NH16
GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATCTTAGG CAAA	NH16IC
GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NH16ICR
UUUGCCUAAAC AUUCCGUGUA CUAGAACAUC AGAC	NH16R

グループBD11:

TTATTATCCG CGAGCCATAT TG	BD11
--------------------------	------

TTCCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NC12
CTTTCCTTAC TTACTCAACG CGTAGCTAAA CCAA	NC12IC
CUUUGCCUAC UUAGCUAAGC CGUACGUAAA CCAA	NC12ICR
UUGCUUOACC UACCCGUGA CUAAGUAAGC AAAC	NC12R

グループNH11:

GGTCAAGTGT CACGTCGCEC TG	NH11
CACGCGGACG TCACACTTGA CC	NH11IC
CAGGCGGACG UCACACUUGA CC	NH11ICR
CGUCAAGUGU CACGUCGCCC UG	NH11R

グループNH12:

GTCTTCTGTC AAGTGTGACG TC	NH12
CACGTACAC TTGACCAAGA AC	NH12IC
CACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NH12ICR
CUUCUUGGUC AAGUGGACG UC	NH12R

グループNH13:

CCGTTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NH13
GCACACTAGA TAGCTATAAC CAACCG	NH13IC
GCACAGUAGA UACCUADAAC CAACCG	NH13ICR
CCGUCGCUA UACCUAUCUA CUGUGC	NH13R

グループNH14:

特表平5-504889 (47)

CAATATGCGT CCGCATAAT AA	BD11C	AAGTCCGCTC AATTTGATCC GT	BJ11C
CAADUAGCCG CCGCCADAAU AA	BD11CR	AAGUCCCGCC AAUUGCAUCC CG	BJ11CR
UUUUUAGCCG CAGCCADAAU UG	BD11R	ACCCAUCAAA UUGACCCGAC UU	BJ11R
グループBC11:		グループBJ12:	
TTAAACATCT TACCAAAAC	BC11	ACTTTGAAGT CAAAACCTAA AC	BJ12
CTTTGCTAAC ATGTTTAA	BC11C	CTTTAAGTTT TCACCTCAAA GT	BJ121C
CUUUGCUAAC AUCUUUAA	BC11CR	CUUUAGUUU UCACUUCAAA CU	BJ121CR
UUAAACAUCU UACCAAAAC	BC11R	ACUUUGAAGU CAAAACUUAA AC	BJ12R
グループBC12:		グループSA11:	
TTGATGTTTA AACTTGCTTC GTGCA	BC12	AATCCAAAGC TTCAAATTC T	SA11
TCCACCAAGC AACTTTAAAC ATCAA	BC121C	AACAATTTCA ACCTTTCCGAT T	SA111C
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC121CR	AACAADUUCA ACCUUUCCAU U	SA111CR
UUGAUGUUUA AACUCCUUG CUGCA	BC12R	AAGCCAAAGC UUCAAUUUCU U	SA11R
グループBP11:		グループSA12:	
CCACACCCAT CCTCTGACA GCGTT	BP11	CGAAACCTGC CATTTCGCTC TT	SA12
AAGCCCTGTC AGACCATGCC TGTCG	BP11C	AACACGCCAA TGCCAGCTTT CC	SA121C
AAGCCUGUCC AGAGGAGUCC UGUGC	BP11CR	AACACGCCAA UGCCAGGUUU CC	SA121CR
CCACACCCAU CCUCUGACA GCGUU	BP11R	CGAAACUCCG CAUUUGCGUC UU	SA12R
グループBI11:		グループSA13:	
ACGCATCAAA TTGACCCGAC TT	BI11	TCCACGATCT AGAAATACAT TGTACAA	SA13
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCCTGCA	SA131C	TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SP131C
UUCUACAAUC UAUUUUACA UCCUGCA	SA131CR	UUCUACUUU UCAGUCAUAA ACUC	SP131CR
UCCACCAUCU AGAAAUACA UGUAGAA	SA13R	CAGUUUAUCA CUGAAACGUC ACAA	SP13R
グループSA14:		から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は	
TCTACTTTTA AAGAAACTAG GTT	SA14	下記の場合のいずれにおいてもアロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA基的とハイブリダイズするという条件下で、	
AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA	SA141C	・ 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、	
AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA	SA141CR	・ 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、	
UCUAGUUUA AAGAAACUAG CUU	SA14R	・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載のアロープ。	
グループSP11:		4. 1種以上の <u>Neisseria meningitidis</u> 株を検出するためのアロープであって、	
GTGACAGATC ACCAACTAAT GCA	SP11	一核酸グループ:	
TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC	SP11C	グループNC11:	
UCCAUUACUU GCGAUUCUCU CAC	SP111CR	CGATCCGTCG TTATTCTACT TCCG	NC11
CUGACAGUUC ACCAAGUAAU GCA	SP11R	CGCAAGTAGA ATAACCAGCC ATCG	NC111C
グループSP12:			
AGGAAGTCCG CATTGCTCTT	SP12		
AAGACCAATC CCGAGTTGCT	SP121C		
AAGACCAATC CCGAGUUCUU	SP121CR		
AGCAACUGCG CAUUGCUUUU	SP12R		
グループSP13:			
CAGTTTATCA CTGAAACGTC AGAA	SP13		

CCCAACUACA AUAACCAACC AUCC NG111CR
CCAGCCGUCC UUAUUCUACU UCCG NG11R

グループNG12:

TTCTTTTACC TACCCGTTCA CTAACTAAGC AAAC NG12
CTTTGCTTAC TTACTCAACG GGTACGTAAA CGAA NG121C
GUUUGCUUAC UGAGUCAACG GGUAGCUAAA CGAA NG121CR
UUGCUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAAC AAAC NG12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

5. 生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae 株を検出するための方法であって、場合に

ケ種子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50℃の範囲及び/又は洗浄温度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記鎖的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

CCCAACTACA ATAACCAACC ATCG

HT及び/又はWT: 50℃、

GUUUGCUUAC UGAGUCAACG GGUAGCUAAA CGAA

HT及び/又はWT: 50℃であることを特徴とする請求項5に記載の生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae 株を検出するための方法。

7. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Neisseria gonorrhoeae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

・請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

・これらのプローブと多数、好ましくは全 Neisser

よりプローブの鎖的配列を又とする(flan king)

2種のプローブ、より好ましくは過化的に高保存性の2種のプローブを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な実性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Neisseria gonorrhoeae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Neisseria gonorrhoeae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

6. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断定性サ

la gonorrhoeae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

・前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

・同一核酸分子を鎖的にし、少なくとも1種が Neisseria gonorrhoeae に対して特異的であり且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

・これらのプローブと Neisseria gonorrhoeae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

・前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

・固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

・該プローブの鎖的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

・酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと Neisseria meningitidis 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は試薬液を生成するために必要な成分と、

・前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

8. 1 種以上の Neisseria meningitidis 株を検出するためのプローブであって、

・核酸グループ：

グループ NM11:

GCTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NM11
CAGGCGGACG TCACACTTGA CC	NM11IC
CAGGCGGACG UCACACUGCA CC	NM11ICR
GCUCAGUGU GACGUCGCCC UG	NM11R

グループ NM12:

GTTCTTGGTC AACTGTGACG TC	NM12
GACGTCACAC TTGACCAAGA AC	NM12IC
CACGUCACAC UGACCAAGA AC	NM12ICR

グループ NM16:

TTTGCCTAAC ATTCCCTTGA CTAGAACATC AGAC	NM16
GTCTGATETT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	NM16IC
GUCUGAUGUU CUACUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NM16ICR
UUUGCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACACG AGAC	NM16R

から選択される核酸に属しており且つ 15 ～ 選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一の RNA 又は DNA 鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

9. 生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの鎖的配列を決定する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介

GUUCUUGGUC AACGUGACG UC NM12R

グループ NM13:

GCCTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NM13
GCACACTAGA TAGCTATAAC CAACCC	NM13IC
GCACACUAGA UAGCUAUAAC CAACCC	NM13ICR
GGGUCGCUA UAGCUAUCUA CUGUCC	NM13R

グループ NM14:

TGCTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NM14
TGCACACTAG ATACCAATAT CGAACGCA	NM14IC
UGCACAGUAG AUACCAUAU CGAACGCA	NM14ICR
UGCGUUGCAU AUGGCUAUU ACUGUGCA	NM14R

グループ NM15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTACGTCGCTCGAATCGATTCTGTTCCATT	NM15
AATCGAACAGAAATCCATTACGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAATA	NM15IC
AAUGGAACAGAAATCCAUUCAGGGCGACGUCACAUUGACCAAGAACAATA	NM15ICR
UUUGUGUUGGUGUAGUGUGACGUGGCGGCGAAUGCAUUCUGUUGCAUU	NM15R

するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項 8 に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

10. ハイブリダイゼーション媒体が、約 $3 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC} = 0.15 \text{ M NaCl}, 0.015 \text{ M}$ クエン酸ナトリウム、 $\text{pH } 7.0$)、約 25 mM のリン酸緩衝液 $\text{pH } 7.1$ 、 2.0% 脱イオン化ホルムアミド、 0.02% Ficoll、 0.02% ウシ血清アルブミン、 0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1 mg/ml の剪断変性サケ精子 DNA を含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約 $3 \times \text{SSC}$ 、 25 mM リン酸緩衝液 $\text{pH } 7.1$ 及び 2.0% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプ

ローブが請求項8に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40〜58℃の範囲及び／又は洗浄温度が約40〜58℃の範囲に適宜調節され、特に、前記優的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

CACGCGCACC TCACACTTGA CC

HT及び／又はWT：45℃、

GACGTACAC TTGACCAAGA AC

HT及び／又はWT：45℃、

GCACACTAGA TAGCTATAAC GAACGC

HT及び／又はWT：40℃、

TGCACACTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

HT及び／又はWT：48℃、

TTTTCTTCTTGGTCAAGCTCTCACCTCCGCTCAATGCTTCTGTTCCATT

HT及び／又はWT：58℃、

GTCTCATGTT CTACTCAAGC GAATGTTAGC CAAA

HT及び／又はWT：50℃であることを特徴とする請求項5に記載の生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis を検出するための方法。

11. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Neisseria meningitidis

ドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの優的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと Neisseria meningitidis 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

12. 1種以上の Haemophilus ducreyi 株を検出するためのプローブであって、

一核酸グループ：

グループBD11：

TTATTATCCG CCAGGCATAT TG

BD11

CAATATGCTT CCGGCATAAT AA

BD11IC

CAAGAUGCCU CGCCCAUAAU AA

BD11ICR

seria meningitidis 株を in vitro 検出するためのキットであって、

一請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数、好ましくは全 Neisseria meningitidis 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を鎖的にし、少なくとも1種が Neisseria meningitidis に対して特異的であり且つ請求項8に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブと Neisseria meningitidis 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッド

UDADUACCG CCAGCCAUUU UC

BD11R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

一夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

一前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

一その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

13. 生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi 株を検出するための方法であって、場合に

よりプローブの優的配列を夾又する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得

る Haemophilus ducreyi 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のアプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Haemophilus ducreyi 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

14. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断活性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアプローブが請求項12に記載のアプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、前記断片的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び

及び洗浄温度(WT)が夫々、

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

HT及び/又はWT:40℃であることを特徴とする請求項13に記載の生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi を検出するための方法。

15. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Haemophilus ducreyi 株を in vitro 検出するためのキットであって、

—請求項12に記載のアプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアプローブと、

—これらのアプローブと多数、好ましくは全 Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連続検出するための手段とを含むか、又は

—同一核酸分子を断片的にし、少なくとも1種が Haemophilus ducreyi に対して特異的であり且つ請求項12に記載のアプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のアプローブと、

—これらのアプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連続検出するための手段とを含むか、又は

—固体支持体に固定された請求項12に記載のアプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアプローブと、

—該アプローブの断片的配列を含むDNA及び/又はRNAの断片的増幅を連続実施するために必要なプライマーと、

—断片的増幅が可能であり及び/又はこれらのアプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連続検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

16. 1種以上の Brachhamella calmar-haileyi 株を検出するためのアプローブであって、

—核酸グループ:

グループBC11:

TTAAACATCT TACCAAAG	BC11
CTTTGCTAAC ATGTTTAA	BC11IC
CUUUGCUAAG AUGUUUAA	BC11ICR
UUAAACAUCU UACCAAAG	BC11R

グループBC12:

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGCA	BC12
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC12IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC12ICR
UGAUGUUUA AACUGGCUUG GUGCA	BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA断片的とハイブリダイズするという条件下で、

—夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

—前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる実質配列を含むことを特徴とするプローブ。

17. 生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な実性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

18. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

tro 検出するためのキットであって、

ー請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Branhamella catarrhalis に対して特異的であり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断抗性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項16に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30〜42℃の範囲及び/又は洗浄温度が約30〜42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々、

CTTTGCTAAC ATGTTTAA

HT及び/又はWT: 30℃

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

HT及び/又はWT: 42℃であることを特徴とする請求項17に記載の生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis を検出するための方法。

19. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 株を検出するための方法であって、

ー固体支持体に固定された請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ー該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Branhamella catarrhalis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

20. 1種以上の Bordetella pertussis 株を検出するためのプローブであって、

ー核酸グループ:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BP11
AAGCCTGTCC ACAGGATGGG TGTGG	BP11IC
AAGCCUGUCC ACAGGATGGG UCUGG	BP11ICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GCGUU	BP11R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下で、

一、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

一、前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

一、その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

21. 生物学的サンプル中で *Bordetella pertussis* 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの鎖的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る *Bordetella pertussis* 株の相補的

核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項20に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る *Bordetella pertussis* 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

22. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、2.0%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの断断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び2.0%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項20に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記鎖的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AAGCCTCTCC AGACGATCGG TGTGG

HT及び/又はWT: 55℃であることを特徴とする請求項21に記載の生物学的サンプル中で *Bordetella pertussis* を検出するための方法。

23. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 *Bordetella pertussis* 株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

一請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数、好ましくは全 *Bordetella pertussis* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を鎖的にし、少なくとも1種が *Bordetella pertussis* に対して特異的であり且つ請求項20に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブと *Bordetella pertu*

ssis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一固体支持体に固定された請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの鎖的配列を含むDNA及び/又はRNAの断断的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一断断的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと *Bordetella pertussis* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

24. 1種以上の Haemophilus influenzae 株を検出するためのプローブであって、

— 核酸グループ:

グループB111:

ACGCAATCAAA TTGACCGCAC TT	B111
AAGTGGGCTC AATTTGATGC GT	B111C
AAGUGCGGUC AAUUGAUGC GU	B111CR
ACGCAUCAAA UGACCGCAC UU	B111R

グループB112:

ACTTTGAAGT GAAACTTAA AG	B112
CTTTAAGTTT TCACCTCAAA GT	B112IC
COUUAAGUUC UCACUCAA AA GU	B112ICR
ACUUAACAAGU GAAACUCAA AG	B112R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA鎖的とハイブリダイズするという条件下、

— 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

×SSC = 0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0), 約25mMのリン酸緩衝液pH7.1, 2.0%脱イオン化ホルムアミド, 0.02% Ficoll, 0.02%ウシ血清アルブミン, 0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの断断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35〜55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35〜55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記鎖的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AAGTGGGCTC AATTTGATGC GT

HT及び/又はWT: 55℃、

CTTTAAGTTT TCACCTCAAA GT

HT及び/又はWT: 35℃であることを特徴とする請求項25に記載の生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae 株を検出するための方法。

27. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Haemophilus influenzae 株を検出するための方法であって、

— 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

— その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

25. 生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの鎖的配列を又又は2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを紹介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Haemophilus influenzae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Haemophilus influenzae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

26. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1

Haemophilus influenzae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

— 請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

— これらのプローブと多数、好ましくは全 Haemophilus influenzae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

— 同一核酸分子を鎖的にし、少なくとも1種が Haemophilus influenzae に対して特異的であり且つ請求項24に記載のプローブのいずれか1個から選択された少なくとも2種のプローブと、

— これらのプローブと Haemophilus influenzae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

— 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項24に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、
- 該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
- 酵素増幅が可能であり及び/又はこれらのプロープと Hae mop h i l u s i n f l u e n z a e 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

28. 1種以上の S t r e p t o c c u s p n e m o n i a e 株を検出するためのプロープであって、

- 核酸グループ:

グループSP11:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA SP11
TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC SP11IC
UGCAUACUU GGUGAUCUCU CAC SP11ICR

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプロープ。

29. 生物学的サンプル中で S t r e p t o c c u s p n e m o n i a e 株を検出するための方法であって、

場合によりプロープの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る S t r e p t o c c u s p n e m o n i a e 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項28に記載のプロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る S t r e p t o c c u s p n e m o n i a e 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

30. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

CUGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA SP11R

グループSP12:

ACGAAGTCGG CATTGGTCTT SP12
AAGACCAATG CGCAGTTCCT SP12IC
AAGACCAATG CGCAGUCCU SP12ICR
ACGAACUGCG CAGUGGUCUU SP12R

グループSP13:

GAGTTTATGA CTCAAAGCTC AGAA SP13
TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC SP13IC
GUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC SP13ICR
GAGUUUAUGA CUGAAAGCUC AGAA SP13R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

・矢々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%P1col1、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの誘断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプロープが請求項24に記載のプロープのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HT及び/又はWT: 45℃、

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

HT及び/又はWT: 45℃、

TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC

HT及び/又はWT: 45℃であることを特徴とする請求

項29に記載の生物学的サンプル中で S t r e p t o c c u s p n e m o n i a e 株を検出するための方法。

31. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

ー請求項28に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

ーこれらのプロープと多数、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Streptococcus pneumoniae に対して特異的であり且つ請求項28に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

ーこれらのプロープと Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

AACAAUUGA ACCUUCCAU U SA11CR

AAUCCAAAGG UUCAAAUUGU U SA11R

グループSA12:

GCAACCTGC CATTTCGTC TT SA12

AAGACGCAAA TGGCAGCTT CC SA12IC

AAGACGCAAA UGCCAGGUU CC SA12ICR

GCAACCUCC CAUUUCCUC U SA12R

グループSA13:

TCCACGATCT ACAATAGAT TCTAGAA SA13

TTCTACAA7C TATTCTAGA TCGTCCA SA13IC

UUCBACAAUC UAUUUCUACA UCGUGCA SA13ICR

UCCACGAUCU ACAABAGAU UCUAGAA SA13R

グループSA14:

TCTAGTTTA AAGAACTAG GTT SA14

AACCTAGTTT CTTTAAACT ACA SA14IC

AACCUAGUUV CUUUAACU ACA SA14ICR

UCUAGUUUA AAGAAACUAG GUU SA14R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプロープが対応する非特異

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー固体支持体に固定された請求項28に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

ー該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの断片的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー断片的増幅が可能であり及び/又はこれらのプロープと Streptococcus pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット、

32. 1種以上の Streptococcus agalactiae 株を検出するためのプロープであって、

ー核酸グループ:

グループSA11:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T SA11

AACAATTTCG ACCTTTCGAT T SA11IC

配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

ー前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

ーその両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプロープ、

33. 生物学的サンプル中で Streptococcus agalactiae 株を検出するための方法であって、場合によりプロープの標的配列を又する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検

出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る Streptococcus agalactiae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項32に記載のプロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Streptococcus

ococcus agalactiae 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

34. ハイブリダイゼーション媒体が、約 $3 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC} = 0.15 \text{ M NaCl}, 0.015 \text{ M}$ クエン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7.0$)、約 25 mM のリン酸緩衝液 $\text{pH} 7.1$ 、 2.0% 脱イオン化ホルムアミド、 0.02% Ficoll、 0.02% ウシ血清アルブミン、 0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1 mg/ml の断断変性サケ精子 DNA を含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約 $3 \times \text{SSC}$ 、 25 mM リン酸緩衝液 $\text{pH} 7.1$ 及び 2.0% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項 32 に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ の範囲及び/又は洗浄温度が約 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ の範囲に適宜調節され、特に、前記の配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が失々、

AACAATTGCA ACCTTTCAT T

HT 及び/又は WT: 35°C 、

—同一核酸分子を断断にし、少なくとも 1 種が Streptococcus agalactiae に対して特異的であり且つ請求項 32 に記載のプローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のプローブと、

—これらのプローブと Streptococcus agalactiae 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—固体支持体に固定された請求項 32 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、

—該プローブの断断配列を含む DNA 及び/又は RNA の断断的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—断断的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Streptococcus agalactiae 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

AAGACGCAAA TGGCAGTTT CC

HT 及び/又は WT: 45°C 、

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCCTGCA

HT 及び/又は WT: 45°C 、

AACCTAGTTT CTTTAAACT ACA

HT 及び/又は WT: 37°C であることを特徴とする請求項 33 に記載の生物学的サンプル中で Streptococcus agalactiae を検出するための方法。

35. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Streptococcus agalactiae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

—請求項 32 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、

—これらのプローブと多数、好ましくは全 Streptococcus agalactiae 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

D を適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

36. 1 種以上の Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件下で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 由来の DNA 及び/又は RNA のみとハイブリダイズし、他の生物由来の DNA 及び/又は RNA とはハイブリダイズしないという条件下で、図 10 に示す $16\text{S}-23\text{S}$ rRNA スペーサー配列から誘導される $15 \sim$ 最大数のヌクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブ。

37. 生物学的サンプル中で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの断断配列を交叉する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介するポリメラーゼ反応を使用して増幅させた検出すべき核酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サ

ンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項36に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

38. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を in vitro 検出するためのキットであって、

—請求項36に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—これらのプローブと多数、好ましくは全 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液

Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

39. 検出すべき微生物に特異的な請求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に in vitro 検出するための方法であって、好ましくはプローブ領域を交叉する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（該的配列を含む）DNA及び/又はRNAを濃縮し、増幅した該的配列と該上のプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより

又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—同一核酸分子を該的にし、少なくとも1種が Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli に対して特異的であり且つ請求項36に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブと Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

—固体支持体に固定された請求項36に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

—該プローブの該的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと

形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することとを特徴とする方法。

40. 生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に in vitro 検出するためのキットであって、

—検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のプローブの少なくとも1種と、

—該プローブの該的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

—酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと検出すべき微生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		EXCLUDED FROM THE SECOND SAMPLY	
Category	Changes of Abstracts, with subsections, their supplements, of the relevant passages		Excluded in Other No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, September 1980, pages 391-392, abstract no. 89352w, (Columbus, Ohio, US), W.E. EVANS et al.: "The use of DNA probes for taxonomic study of Dictyostellium wild isolates", & GENETICS 1988, 119(3), 561-9, see abstract		1
A	--- BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 11, November 1987, abstract no. 104704, (Philadelphia, PA, US), M. VERMA et al.: "Phylogenetic implication of heterogeneity of the nontranscribed spacer of ribosomal DNA repeating units in various Neurospora and related fungal species", & CURR. GENET. 11(4): 309-314, 1987, see abstract		1
A	--- EP.A.03072720 (INSTITUT PASTEUR) 15 March 1989, see abstract; pages 3,4; claims 1-5		1
P.A	EP.A.0395292 (BIORESEARCH IRELAND) 31 October 1990, see abstract; page 6, lines 40-41		1
A	--- EP.A.0337896 (N.V. INNOGENETICS S.A.) 18 October 1989		
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 9, 28 August 1989, page 204, abstract no. 72106x, (Columbus, Ohio, US), R. ROSSAU et al.: "Specific Neisseria gonorrhoeae DNA probes derived from ribosomal rRNA", & J. GEN. MICROBIOL. 1989, 135(6), 1733-45, see abstract		1

EP 9100743
SA 46810

This annex lists the person family members relating to the person documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as assigned to the European Patent Office EOP file on (15/09/79). The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information.

Project document linked to research report	Publication date	Project budget (amount in \$)	Publication date
EP-A- 0307270	15-03-89	JP-A- 1157400	20-06-89
EP-A- 0395292	31-10-90	AD-A- 5365290 JP-A- 3110089	23-10-90 03-06-91
EP-A- 0337896	18-10-89	AU-A- 3200489 JP-A- 2203800	19-10-89 11-08-90

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 9

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 15/11
C 12 R 1:44)
(C 12 N 15/11
C 12 R 1:01)

⑥発 明 者 パン・フーベルスウィン, ヒュ ベルギー国、ペー—9288・ラールネ、コルマンストラート・62
ーホ